



**Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare e Cellulare**

**Tesi di Laurea**

**Anno accademico 2013-2014**

**Analisi molecolare del fenotipo indotta  
da sovraespressione del fattore *PDGF-B*  
in animal caps e embrioni di *Xenopus  
laevis***

Candidato

Relatore

**Federico Pardini**

**Dott.ssa Michela Ori**

# INDICE

## Riassunto e Abstract

<b>1. Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1. Funzioni del <i>PDGF</i>	1
1.2. Sistema di segnalazione del <i>PDGF-B</i>	3
1.3. Ruolo del <i>PDGF</i> nello sviluppo embrionale	8
1.4. Ruolo del <i>PDGF</i> nello sviluppo del SNC	11
1.5. Ruolo del <i>PDGF-B</i> nello sviluppo dei gliomi	13
1.6. La cresta neurale cranica	17
1.7. Animal caps in <i>Xenopus laevis</i>	20
1.8. <i>Xenopus laevis</i> come sistema modello	22
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiali e metodi</b>	<b>24</b>
3.1. Digestione di plasmidi con enzimi di restrizione	24
3.2. Purificazione del DNA	25
3.2.1. Estrazione fenolica	25
3.2.2. Precipitazione alcolica	25
3.3. Embrioni di <i>Xenopus laevis</i>	26
3.4. Microiniezione	28
3.4.1. Microiniezione in embrioni di <i>Xenopus laevis</i>	28
3.4.2. Sintesi in vitro dei trascritti da microiniettare	29
3.4.3. Trascritti microiniettati	31
3.5. Reazione cromogenica per la galattosidasi	31
3.6. Ibridazione <i>in situ</i>	33

3.6.1. Preparazione della sonda	33
3.6.2. Ibridazione <i>in situ</i> “whole mount”	34
3.6.3. Depigmentazione (“Bleaching”)	38
3.7. Animal caps Assay	39
3.7.1. Produzione animal caps	39
3.7.2.1. Estrazione di RNA totale da caps iniettati e caps di controllo	41
3.7.2.2. Trattamento con DNasi e precipitazione	43
3.7.3. “Reverse transcriptase-polymerase chain reaction” (RT-PCR)	44
3.7.4. “Polymerase chain reaction” (PCR) per marcatori specifici	45
3.8. Elettroforesi su gel d’agarosio	47
<b>4. Risultati</b>	49
4.1. Analisi funzionale del gene <i>hPDGF-B</i>	49
4.2. Analisi delle alterazioni a livello delle creste neurali craniche in embrioni di <i>Xenopus laevis</i> microiniettati con il gene <i>hPDGF-B</i>	51
4.3. Analisi tramite marcatore di creste neurali in animal caps prodotti da embrioni iniettati con <i>hPDGF-B</i>	72
<b>5. Discussione</b>	77
5.1. Premessa	77
5.2. La sovraespressione dell’ <i>hPDGF-B</i> altera la migrazione delle cellule delle creste neurali craniche	79
5.3. La sovraespressione dell’ <i>hPDGF-B</i> non altera la stabilità dei compartimenti cellulari	80
5.4.1. <i>hPDGF-B</i> : effetto induttivo?	81
5.4.2. <i>hPDGF-B</i> : o effetto chemoattraente?	82
<b>6. Conclusioni</b>	84
<b>Bibliografia</b>	85

# Riassunto

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (*PDGF-B*) svolge molteplici funzioni sia nella vita adulta che durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati. In particolare, nel sistema nervoso centrale, tale fattore è stato trovato sovraespresso in particolari tumori cerebrali, notevolmente aggressivi e pressoché incurabili, conosciuti con il nome di glomi. Studi recenti condotti *in vivo* e *in vitro* sul ruolo del *PDGF-B*, hanno mostrato come tale fattore sia implicato nei meccanismi cellulari coinvolti nella progressione del glioma: in particolare, il *PDGF-B* sembra favorire la motilità e l'invasività delle cellule tumorali inducendo la perdita dell'inibizione da contatto cellula-cellula, come suggerito da studi condotti su un modello murino di glioma indotto da *PDGF-B*.

Prendendo spunto da tali premesse, nello svolgere il mio lavoro di tesi, ho potuto prendere parte ad un progetto di ricerca nato in collaborazione con il Dott. Paolo Malatesta dell'Istituto Tumori di Genova, con il proposito di analizzare i processi molecolari coinvolti nella modificazione del comportamento delle cellule delle creste neurali in seguito all'attivazione del "pathway" diretto dal *PDGF-B*. Nello specifico, durante il mio internato di tesi, ho inizialmente esaminato il comportamento di una particolare popolazione cellulare, le cellule della cresta neurale cranica (NCC), in seguito a sovraespressione del fattore *PDGF-B* in embrioni di *Xenopus laevis*. A questo scopo ho sintetizzato specifiche sonde ad RNA antisenso marcate con digossigenina e le ho utilizzate in esperimenti di ibridazione in situ "whole mount" su embrioni di *Xenopus laevis* microiniettati con RNA messaggero di *PDGF-B* su un solo lato dell'embrione. L'analisi è stata condotta utilizzando sonde specifiche per marcatori di creste neurali (es. *Twist*, *Slug* etc.). I risultati ottenuti suggeriscono un potenziale ruolo del *PDGF-B* nel regolare il comportamento delle cellule delle creste neurali in *Xenopus*. In particolare la sovraespressione del *PDGF-B* nel sistema nervoso e nelle creste neurali può causare una compromissione della segmentazione delle NCC in "streams" stereotipati suggerendo un possibile difetto

nelle interazioni cellula-cellula. Queste cellule presentano inoltre un forte ritardo nella migrazione, sia a stadi precoci che a stadi più tardivi di sviluppo.

Inaspettatamente ho inoltre notato negli embrioni iniettati un'alta frequenza di embrioni che presentavano spots ectopici di creste neurali. Per tentare di comprendere questo fenomeno e valutare se l'azione del *PDGF-B* fosse in grado – indipendentemente dall'influenza di altri fattori – di indurre formazione di creste neurali, sto conducendo esperimenti su animal caps, prelevati da embrioni precedentemente microiniettati con RNA messaggero di *PDGF-B* su entrambi i lati. Dagli animal caps ho estratto l'RNA, e ho ottenuto il cDNA tramite retrotrascrizione: sto utilizzando quest'ultimo per saggi di PCR al fine di valutare la presenza di eventuali marcatori specifici per le creste neurali. Contemporaneamente stiamo tentando di effettuare trapianti delle cellule delle creste neurali sovraesprimenti *PDGF-B* in embrioni di controllo per verificarne il comportamento di queste cellule in un ambiente non esprimente il *PDGF-B*.

I risultati ottenuti insieme agli studi condotti dal gruppo del Dott. Malatesta potrebbero contribuire a chiarire le basi molecolari della tumorigenicità indotta da *PDGF-B* nell'ottica di futuri approcci terapeutici.

# Abstract

Gliomas are aggressive glial tumors, almost incurable. Evidence gained from studies on animal models has firmly established a causal connection between aberrant *PDGF-B* signalling and the formation of some gliomas. Recent data about the cellular mechanisms of *PDGF-B* driven glioma progression and maintenance indicate that *PDGF-B* may be required, unexpectedly, to override cell contact inhibition and promote glioma cell infiltration. The aim of my project is to study key aspects of the biological activity of *PDGF-B* signalling in vivo in regulating cell adhesion properties. To do this, *Xenopus laevis* Neural Crest Cells (NCC) were used as a model as this population is known to share many similarities with cancer cells.

First off all, I overexpressed *hPDGF-B* in *Xenopus* embryos by mRNA microinjections and then I monitored NCC behaviour at different developmental time points.

By whole mount *in situ* hybridization analysis I showed a clear migratory alterations in NCC overexpressing the *hPDGF-B*.

Interestingly and unexpectedly, I also observed the formation of ectopic NCC clusters in the injected side of the embryos. In order to verify whether *PDGF-B* was able not only to alter NCC behavior but also to induce NCC specification, I performed animal caps assays and PCR experiments.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Funzioni del *PDGF*

La famiglia del *PDGF* è composta da quattro ligandi, *PDGFA*, *PDGFB*, *PDGFC* e *PDGFD*. Tale fattore di crescita è stato individuato e identificato come prodotto secretorio delle piastrine (Balk 1971; Busch et al. 1976) e come componente del siero responsabile della proliferazione delle cellule della muscolatura liscia arteriosa (Ross et al. 1974). Studi condotti in vitro ed in vivo su organismi modello hanno suggerito l'espressione di tale fattore in una variegata moltitudine di tessuti e hanno dimostrato il suo pieno coinvolgimento in vari processi di natura biologica quali la migrazione cellulare, lo sviluppo, la proliferazione e la formazione di nuovi vasi (angiogenesi).

Il *PDGF* è prodotto a partire da vari tipi cellulari: monociti/macrofagi, fibroblasti, citotrofoblasti della placenta, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, neuroni e alcune cellule della glia (Heldin e Westermark 1990; Raines et al. 1990; Raines e Ross 1993).

Data la sua natura di fattore di crescita, il *PDGF* risulta essere un potente mitogeno, in grado - con la sua azione - di indurre la proliferazione cellulare del tessuto connettivo della muscolatura liscia, in aggiunta a fibroblasti e cellule di derivazione neuroectodermica, tra cui si annoverano cellule staminali neurali adulte, embrionali e cellule gliali (Raines et al. 1990). Oltre alla sua forte azione mitogena, tale fattore risulta implicato in processi chemiotattici perché in grado di reclutare diversi tipi cellulari, indotti a migrare in determinati punti di un tessuto (Grotendorst et al. 1982; Siegbahn et al. 1990); tale caratteristica è importante poiché nel caso che un dato tessuto subisca un trauma come una lacerazione, viene a prodursi un coagulo veicolato in cui le piastrine presenti rilasciano *PDGF*: quest'ultimo grazie alle

proprietà in precedenza descritte, è in grado di richiamare fibroblasti e macrofagi e di indurre la proliferazione localizzata; i fibroblasti sostituiscono infatti le cellule morte riproducendo e rigenerando in tal modo il tessuto. L'azione di questo fattore ha effetti sicuramente di natura autocrina sulle cellule che si occupano della sua produzione, ma è capace anche di notevoli effetti paracrini su altri tipi cellulari.

Il *PDGF* sembra inoltre anche coinvolto nel differenziamento cellulare (Raff et al. 1989; Richardson et al. 1990) e nella regolazione della produzione di componenti della matrice extracellulare (Owen et al. 1982; Majack et al. 1985).

In particolare, il fattore *PDGF-B* è stato studiato e analizzato per il suo coinvolgimento nei processi di cancerogenesi; in particolare è stata analizzata la sua espressione nei gliomi, neoplasie del Sistema Nervoso Centrale (SNC): in questi tumori aggressivi si è notata una sovraespressione sia del recettore, sia del ligando (Hermanson et al. 1992; Nister et al. 1988) e tale sovraespressione ha portato ad una stimolazione paracrina e/o autocrina alla crescita del tumore (Hermansson et al. 1988).

L'espressione del *PDGF-B* e del suo recettore è stata rintracciata in diversi tipi tumorali tra cui si annoverano tumori del SNC – come in precedenza spiegato – ma anche sarcomi, tumori delle cellule della linea germinale e carcinomi del sistema gastrointestinale: il legame tra il *PDGF-B* e la produzione di tutta questa serie di tumori, è stata inizialmente dimostrata tramite la scoperta che l'oncogene *v-sis* del virus del sarcoma delle scimmie, risulta essere un omologo retrovirale del gene cellulare che porta alla codifica della catena  $\beta$  del *PDGF* (Doolittle et al. 1983; Waterfield et al. 1983).

La via di segnalazione del *PDGF-B* è direttamente coinvolta nei gliomi, nei tumori delle cellule della glia di supporto, come astrociti o oligodendrociti, nel sistema nervoso centrale; ruolo importante e fondamentale che si può capire dalle sue funzioni nei processi di trasduzione del segnale e nella regolazione di uno sviluppo normale.

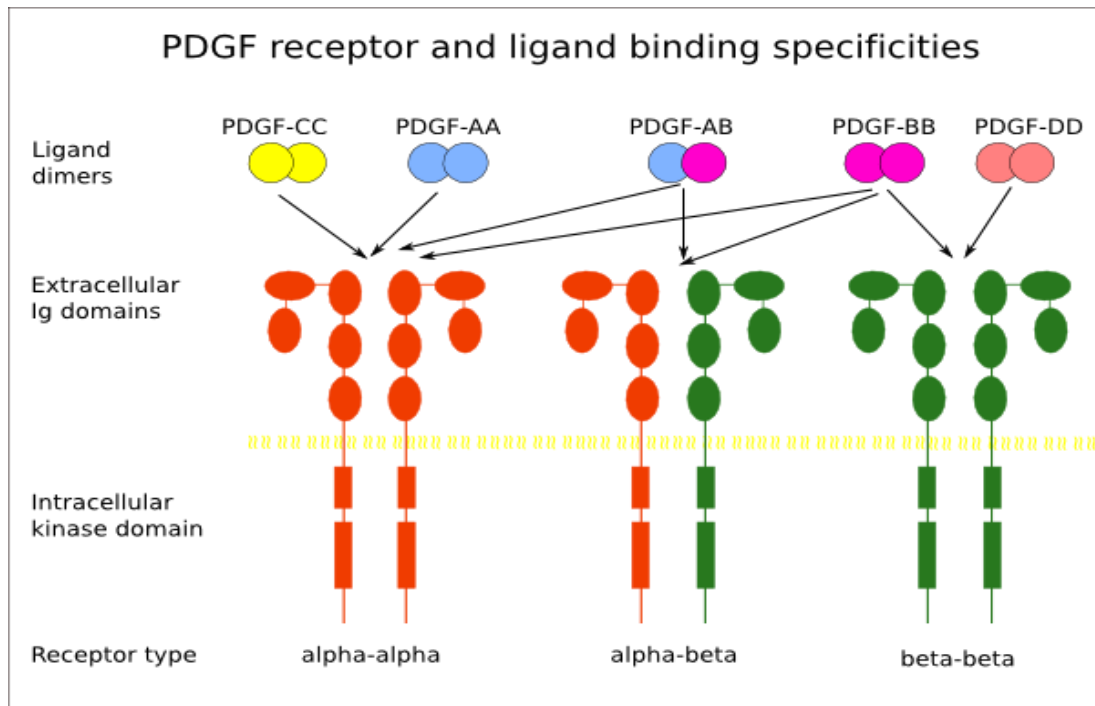


## 1.2 Sistema di segnalazione del *PDGF-B*

Il gene del *PDGF-B* è situato sul cromosoma 22 ed è composto da sette esoni intercalati da introni di dimensioni diverse. La proteina matura è codificata per la maggior parte dall'esone 4 e dall'esone 5. Una caratteristica comune a tutti i membri della famiglia del *PDGF* è un motivo conservato di otto cisteine; nella struttura terziaria della proteina matura sono presenti infatti ponti disolfuro intramolecolari che ne determinano la conformazione finale: i residui di cisteina 1 e 6, e 3 e 7, rispettivamente, sembrano essenziali per l'attività biologica del *PDGF-B* stesso (Giese et al. 1987; Sauer e Donaghue 1988; Ostman et al. 1992; Heldin et al. 1993). Il trascritto del *PDGF-B* può presentarsi in due forme distinte – in seguito a splicing alternativo – che differiscono tra loro nelle regioni non tradotte al 5'UTR e sono identificabili nello sviluppo del cervello di ratto (Sasahara et al. 1998).

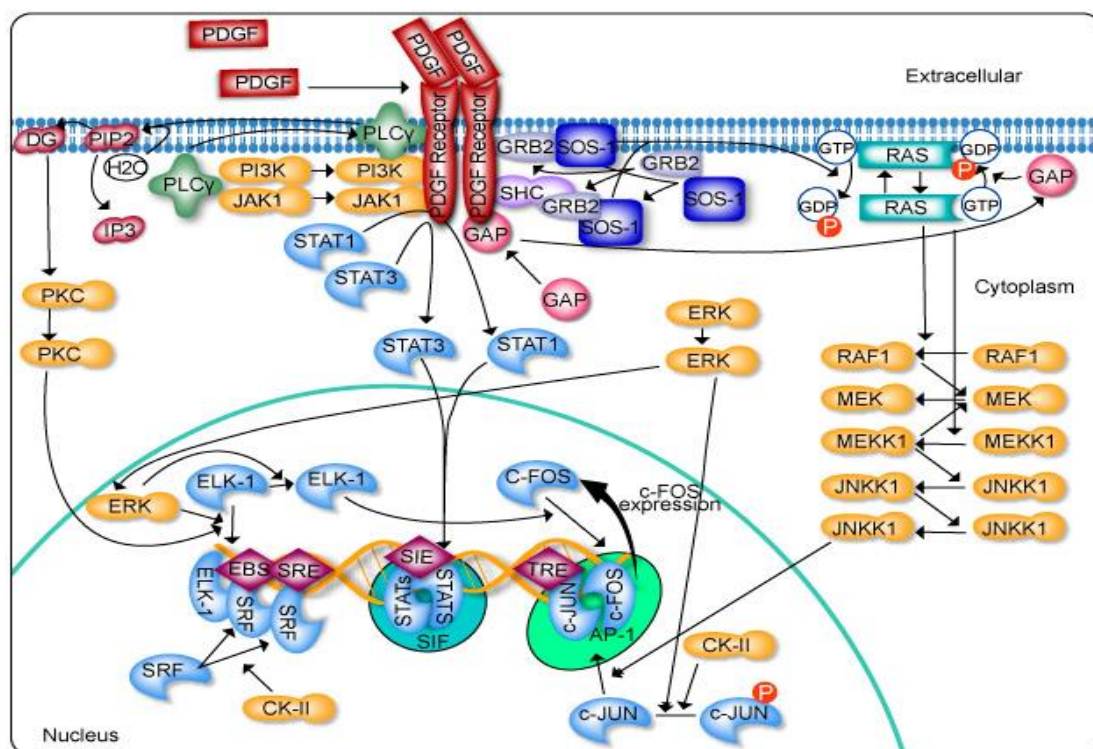
La famiglia del *PDGF* – come esplicito in precedenza – si compone di quattro ligandi (*PDGFA-D*) e due diversi recettori (*PDGFR $\alpha$*  e *PDGFR $\beta$* ) che sono a loro volta appartenenti alla superfamiglia di recettori tirosina chinasi, il cui massimo esponente è rappresentato dal recettore per il fattore di crescita endoteliale vascolare (*VEGF*). Il *PDGF* ha una struttura comune dimerica permessa grazie alla formazione di legami covalenti tramite ponti disolfuro: tutti i ligandi (*PDGFA-D*) sono in grado di formare omodimeri; in particolare però il ligando *PDGF-A* e il ligando *PDGF-B* possono anche produrre un eterodimero funzionale (AB). I recettori  $\alpha$  e  $\beta$  possono dare origine agli omodimeri  $\alpha\alpha$  e  $\beta\beta$  o agli eterodimeri  $\alpha\beta$ : ciascuno di loro ha proprietà di segnalazione diverse. I ligandi hanno infatti diversa affinità per le differenti combinazioni di recettori; tutto ciò è dovuto al fatto che le porzioni extracellulari dei recettori hanno solo il 31% di identità fra loro (Heldin e Westermark, 1999; Li et al. 2000; Bergsten et al. 2001; LaRochelle et al. 2001).

In particolare il ligando AA viene a legarsi esclusivamente al recettore  $\alpha\alpha$ ; i ligandi CC e AB possono legarsi indistintamente ai recettori  $\alpha\alpha$  e  $\alpha\beta$ ; il ligando DD può legarsi ad  $\alpha\beta$  e  $\beta\beta$ ; ed infine il ligando BB può prendere contatto con tutti e tre i tipi di recettori (Figura 1.1).



**Fig 1.1:** Recettori e ligandi della famiglia del *PDGF*; le frecce direzionali indicano le possibili interazioni con i recettori

I recettori per il *PDGF* hanno cinque domini immunoglobulinici nelle porzione extracellulare – porzione adibita al reclutamento del ligando – e una porzione citoplasmatica dove è presente un dominio tirosina chinasi. Il contatto tra ligando e recettore porta alla dimerizzazione del recettore stesso e all’attivazione del dominio citoplasmatico che va incontro ad un processo di autofosforilazione dei diversi residui di tirosina presenti; tale meccanismo consente l’attacco al recettore di numerosi complessi proteici e multiproteici che portano all’attivazione di numerose vie di segnalazione (Fig 1.2).



**Fig 1.2:** Vie di trasduzione associate ai recettori per il *PDGF*

Gli esiti di tali variegata vie di segnalazione sono tra i più disparati: proliferazione cellulare, migrazione, deposizione di matrice, sopravvivenza e transizione epitelio mesenchimatica (Betsholtz et al. 2001); in particolare, uno di questi “pathway” comprende ad esempio l’attivazione della via delle *MAPK* (mitogen-activated protein kinase) che è una treonina/serina chinasi in grado di controllare innumerevoli processi quali la mitosi, l’apoptosi cellulare e il differenziamento; altri pathways importanti mediati dall’azione del *PDGF* sono inoltre quelli mediati dalla fosfatidilinositolo 3-chinasi (*PI3K*), dalla chinasi della famiglia *SRC*, dai fattori di trascrizione *STAT*, e dalla fosfolipasi CQ (*PLCQ*). Tuttavia anche se nei due distinti recettori è stata riscontrata un’attività molto simile, la via di segnalazione che viene ad attivarsi ogni qualvolta un dato ligando lega il suo recettore, è estremamente specifica e anche il grado con cui tale attivazione si presenta è distinto fra i due recettori (Heidaran et al. 1993). Esperimenti di sostituzione in vivo di una subunità di un recettore con la subunità dell’altro – in maniera tale che nell’organismo siano

presenti domini intracellulari solo di un tipo – non portano tale organismo a condurre uno sviluppo normale (Klinghoffer et al. 2001): ogni recettore ha quindi un'unica e ben definita risposta di trasduzione del segnale dopo il contatto con il ligando (Shih et al. 2006).

Alcune vie di segnalazione attivate dal *PDGF* sono implicate nello sviluppo gliale e nella gliomagenesi: tuttavia anche se il *PDGF* è in grado di attivare tali vie, il modo e la misura con cui il *PDGF* contribuisce alla loro attivazione nei tumori non è stata per lo più definita.

I vari “pathways” connessi intimamente all'azione del *PDGF* prevedono un meccanismo comune di reclutamento di componenti di segnalazione al recettore attivo: in particolare i residui tirosina chinasi fosforilati nel dominio citoplasmatico del *PDGFR* permettono l'ancoraggio di diverse proteine contenenti un dominio SH2. Nello specifico, due proteine contenenti tale dominio (Shc e Grb2), legandosi alla porzione intracellulare del recettore *PDGFR* sono capaci di reclutare Sos, un fattore necessario allo scambio tra il GDP e il GTP sull'oncogene Ras, membro della famiglia di proteine in grado di legare nucleotidi guanosinici (proteine G) e avente appunto attività GTP-asi. Una volta attivato, Ras induce segnali mitogenici attraverso la via di segnalazione delle *MAPK*: questo porta in ultima istanza ad un effetto di sovraregolazione di geni target proliferativi.

Un'altra via di segnalazione attivata dal *PDGFR* – come spiegato in precedenza – coinvolge l'enzima PI3-chinasi, composto di una subunità catalitica ed una subunità regolatrice. Tale enzima, reclutato sulla membrana grazie al suo dominio SH2, presente sulla subunità regolatrice, se fosforilato converte il lipide di membrana fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (*PIP2*) in fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (*PIP3*), che esplicando la sua azione e reclutando una serina chinasi specifica, Akt – che ha diversi substrati target con cui interagire – promuove la sopravvivenza e la crescita cellulare. Tali “pathway” sono inoltre in grado di regolare l'efficienza di traduzione di mRNA specifici all'interno della cellula (Rajasekhar et al. 2003). Attraverso l'utilizzo di metodiche come il “western blotting” sono stati rintracciati e identificati

i vari componenti attivati dalla via di segnalazione delle *MAPK* e dal fattore Akt in vari campioni chirurgici di glioblastoma (Holland et al. 2000).

Le tirosin-chinasi della famiglia Src (SFK) sono un altro elemento di segnalazione di *PDGFR* e giocano un ruolo importante nella regolazione della trasduzione del segnale mediata dai recettori di membrana nel compartimento citoplasmatico. Queste chinasi contengono un dominio SH2 che si lega alla tirosina fosforilata nel recettore *PDGF*. Gli SFK sono enzimi che controllano la crescita, il differenziamento, la migrazione e la sopravvivenza cellulare. È stato inoltre dimostrato che la chinasi della famiglia Src, Fyn, è coinvolta nella differenziazione degli oligodendrociti attraverso la regolazione delle proteine che regolano Rho (Wolf et al. 2001).

Un'ulteriore "pathway" attivato dal recettore *PDGFR* è quello che vede coinvolto l'enzima PLC $\gamma$ , che esplica la sua azione una volta fosforilato a livello di membrana; la sua azione prevede la rottura di PIP2 – precedentemente descritto – in due prodotti distinti: l'inositolo 1,4,5 trifosfato e il diacilglicerolo; quest'ultimo è capace di mobilitare le riserve di calcio intracellulare. L'azione di PLC $\gamma$  e la immediatamente successiva attivazione della proteina PKC (protein kinase C) sono state collegate direttamente a fenomeni di proliferazione e invasività cellulare (Khoshyomn et al. 1999; Da Rocha et al. 2002). ). I *PDGFR* sono stati collegati all'attivazione delle Jak chinasi e la successiva attivazione dei loro substrati, i fattori di trascrizione Stat (Vignais et al. 1996).

Inoltre, la segnalazione Stat in risposta al "pathway" del fattore neurotrofico ciliare (CNTF) può promuovere il differenziamento degli astrociti gliali dalle cellule precursori neuronali (Bonni et al. 1997).

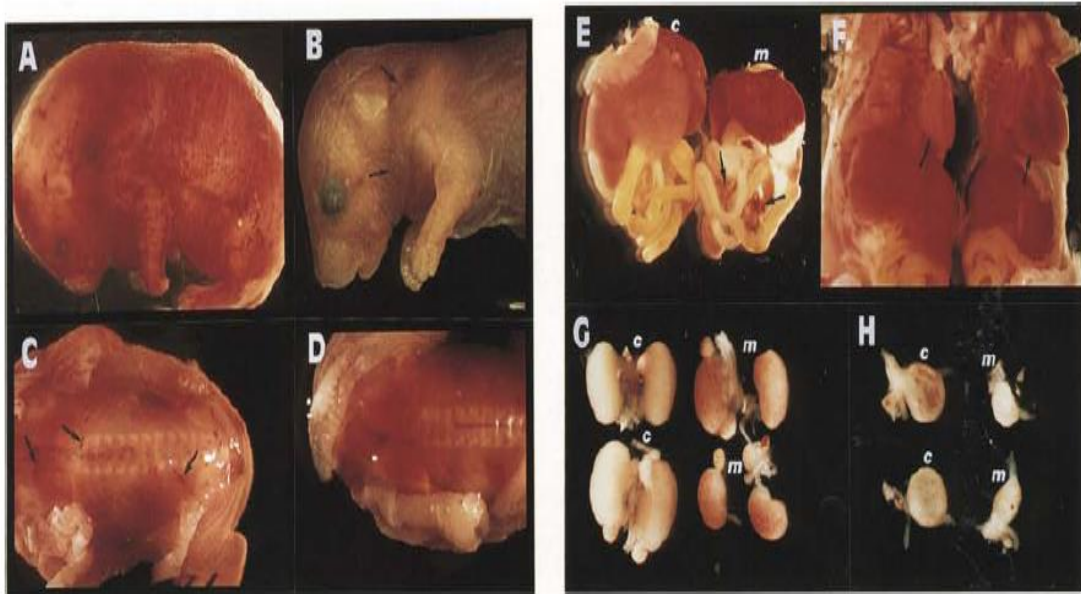
Il "signaling" del *PDGF* risulta essere quindi estremamente variegato e implicato in moltissimi processi a livello cellulare; bisogna tuttavia tenere presente e distinguere in modo marcato la stimolazione cui può andare incontro questo fattore di crescita: a breve termine, quindi transiente e di rapida durata o a lungo termine, quindi cronica e persistente; sembra infatti quest'ultima quella da più vicino coinvolta nel fenomeno della tumorigenesi gliale in vivo (Shih et al. 2006).

### 1.3 Ruolo del *PDGF* nello sviluppo embrionale

Il fattore *PDGF* assume distinti ruoli nell'embriogenesi dei mammiferi a vari stadi di sviluppo. Per la sua azione naturale di mitogeno durante le primissime fasi guida la proliferazione del mesenchima indifferenziato e di alcune popolazioni di cellule progenitrici (Betsholtz et al. 2001). Per esempio, la segnalazione del *PDGFR* è essenziale per la proliferazione delle cellule interstiziali nel testicolo embrionale precoce e nei reni, e per la proliferazione mesenchimale nell'intestino precoce, nella pelle e nello sviluppo del polmone (Karlsson et al. 2000; Li et al. 2000; Li e Hoyle et al. 2001; Brennan et al. 2003).

Nelle successive fasi di maturazione, il "pathway" di segnalazione del *PDGF* è strettamente coinvolto nel differenziamento cellulare e nel rimodellamento dei tessuti, oltre che nel processo di morfogenesi. In *Drosophila melanogaster* e nel topo, tale fattore controlla eventi di migrazione cellulare nella breve e lunga distanza.

In vivo, le informazioni sul ruolo del *PDGF* sono state acquisite per lo più studiando i "pattern" di espressione del recettore *PDGFR* e del suo ligando e/o attraverso esperimenti di perdita di funzione: topi *knockout* sia per il recettore sia per il ligando stesso presentano numerose anomalie tra cui formazione di glomeruli renali anormali, anemia, trombocitopenia, dilatazione dei vasi sanguinei e delle camere cardiache, emorragie ed edema che possono portare a morte perinatale (Levéen et al. 1994; Soriano et al. 1994) (Figura 1.3).



**Fig. 1.3:** Embrioni *PDGF-B* mutato. (A) Caratteristiche esterne di un embrione mutante a E18.5. Si noti l'aspetto emorragico ed edematoso. (B) Aspetto esterno di un embrione mutante a E19. (CH) Mutanti di *PDGF-B* (m) e controlli (c) a stadio E19.

(C) Sanguinamento localizzato (frecce) sotto la pelle e nel grasso bruno di un embrione mutante E19. (D) Aspetto corrispondente di un embrione normale E19. (E) Organi addominali di un embrione di controllo E19 (c) e un mutante (m). Notare le emorragie nel fegato e la dilatazione dei vasi sanguigni mesenterici (frecce). (F) Organi del torace di un embrione di controllo E19 (a sinistra) e un mutante (a destra); le frecce indicano il cuore. (G) Il fenotipo del rene di due coppie di reni mutanti (m) a stadio E19 a confronto con due coppie di reni di controllo (c). (H) Vesciche delle vie urinarie da due embrioni di controllo (c) e due mutanti (m) E19.

**(Levéen et al. 1994; Soriano et al. 1994)**

Questi topi presentano moltissime anomalie anatomiche oltre che istologiche: i capillari glomerulari del rene non si formano e più anse di capillari non ramificate vanno a riempire lo spazio glomerulare; molti vasi non sono inoltre completamente coperti da cellule murali (Levéen et al. 1994; Soriano et al. 1994). Questo comporta un iperproliferazione delle cellule endoteliali che producono in tal modo capillari ectopici, dilatati e fortemente instabili, soggetti a degenerazione (Lindahl et al. 1997; Hellstrom et al. 2001; Enge et al. 2002). Persino il cuore e molte grandi arterie

vanno incontro a dilatazione in embrioni a stadi più tardivi. Lo status ematologico degli embrioni morti per emorragia prima di nascere comprende eritroblastosi, anemia macrocitica, e trombocitopenia. Tali risultati suggeriscono che il *PDGF-B* è fortemente implicato nella creazione di alcune tra le più importanti funzioni renali e vascolari. Nel sistema vascolare, tale fattore è espresso dalle cellule endoteliali e il suo recettore *PDGFRβ* è presente sulle cellule muscolari lisce vascolari nonché sui periciti, cellule deputate al sostegno e allo sviluppo dei vasi. E' stato analizzato in modello murino il fenomeno della neovascolarizzazione: la sovraespressione di *PDGF-B* porta alla stimolazione dell'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (*VEGF*); questi due fattori infatti cooperano congiuntamente nella formazione di nuovi vasi, favorendo la proliferazione controllata delle cellule endoteliali vascolari e reclutando – nelle fasi terminali della neoangiogenesi – periciti sui vasi neoformati (Levéen et al. 1994; Soriano et al. 1994; Lindahl et al. 1997; Benjamin et al. 1998; Heldin et al. 1999; Hellstrom et al. 2001; Guo et al. 2003). Anomalie in questa rete di segnalazione paracrina portano a diversi difetti nella produzione di nuovi vasi: in prima istanza, le cellule endoteliali vanno incontro a proliferazione non controllata e non regolata che porta alla formazione di vasi aberranti ed emorragie; in secondo luogo non vengono ad essere reclutati i periciti e le cellule di sostegno, evento che conferisce instabilità a livello del sistema vascolare. Questo, in sintesi, indica che il *PDGF* è estremamente importante nel processo di angiogenesi nei tessuti adulti (Cao et al. 2003; Guo et al. 2003) e risulta essere essenziale per la crescita, l'invasione e la produzione di metastasi maligne in vari tumori.

Studi recenti hanno visto il ruolo angiogenico del *PDGF-B* anche in neoplasie ematologiche tra cui il mieloma multiplo (Tsirakis et al. 2011).

Sono stati condotti altri studi sui topi con "knockout" condizionale che alterano l'attività del *PDGF* senza causare una mortalità precoce. Anche la retina è particolarmente sensibile alle mutazioni nel dominio del *PDGFR*: topi mutanti (che sopravvivono fino all'età adulta) mostrano la retinopatia proliferativa (Freyberger et al. 2000). Ciò può derivare da una sovraespressione del *PDGF* negli astrociti o da



una carenza del *PDGF* nell'endotelio vascolare; entrambi si traducono in una carenza di periciti (Fruttiger et al. 1996; Klinghoffer et al. 2001; Enge et al. 2002; Forsberg Nilsson et al. 2003).

#### **1.4. Ruolo del *PDGF* nello sviluppo del SNC**

Il signaling del *PDGF* esercita funzioni multiple anche durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Il profilo di espressione del *PDGF* nel SNC durante lo sviluppo embrionale è stato analizzato sia in topo che in *Xenopus laevis* (Shih et al. 2006).

Il *PDGF-B* è distribuito nei neuroni in diverse regioni del sistema nervoso centrale dell'embrione e dell'adulto (Sasahara et al. 1992). L'espressione più accentuata si registra nelle fibre del nervo olfattivo e rimane a un livello elevato nel sistema olfattivo adulto. Poiché i neuroni sensoriali primari del sistema olfattivo conservano la capacità di rigenerarsi nell'adulto, questo risultato è in accordo con il ruolo suggerito dal *PDGF* come fattore neurotrofico. Le cellule di Schwann, le cellule mielinizzanti del sistema nervoso periferico, esprimono il recettore *PDGF* (e rispondono al *PDGF-B* con una maggiore proliferazione in vitro (Davis et al. 1990, Eccleston et al. 1990).

Il *PDGF-A* si trova espresso nei neuroni a partire da E15 e continua ad essere espresso nelle fasi adulte, anche il *PDGF-B* è espresso nei neuroni, ma in maniera più limitata (Yeh et al. 1991; Sasahara et al. 1991). I *PDGF-A* e *PDGFR* sono presenti durante l'embriogenesi, con ruoli essenziali in molti contesti, tra cui il sistema nervoso centrale, la cresta neurale e lo sviluppo degli organi (Leveen et al. 1994;. Soriano et al. 1994; Soriano et al. 1997; Fruttiger et al.1999; Gnessi et al. 2000; Karlsson et al. 2000). In particolare *PDGF-A* e *PDGFR* sono responsabili della proliferazione, della sopravvivenza, della migrazione e del differenziamento delle cellule progenitrici gliali, durante lo sviluppo degli oligodendrociti. Nel sistema nervoso centrale dei mammiferi gli oligodendrociti depositano uno strato isolante di

mielina intorno alle proiezioni neuronali; queste guaine mieliniche sono essenziali nel facilitare la neurotrasmissione. Gli oligodendrociti differenziano dopo la nascita dalle cellule progenitrici che esprimono *PDGFR* (O2A). Linee di topo knockout *PDGF-A* e *PDGFR* mostrano difetti nella mielinizzazione del SNC, a causa di difetti di migrazione, di sopravvivenza e differenziazione di cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) (Baron et al. 2002; Calver et al. 1998; Fruttiger et al. 1999; Klinghoffer et al. 2002) e sviluppano un fenotipo di tremore muscolare (Fruttiger et al. 1999). I contributi di diverse vie di segnalazione all'attività del *PDGFR* nella regolazione dello sviluppo della linea degli oligodendrociti sono stati analizzati in vitro ed in vivo mediante la delezione mirata di residui critici di tirosina nel dominio intracellulare che legano particolari componenti di segnalazione. Si è osservato che l'attivazione di entrambe le vie di segnalazione Src e *PI3K* sono necessarie per una corretta mielinizzazione del SNC (Klinghoffer et al. 2002). Questa giustapposizione di espressione dei ligandi nei neuroni e dei recettori nelle cellule gliali suggerisce che i neuroni sono in grado di fornire i fattori trofici di crescita necessari ai precursori gliali.

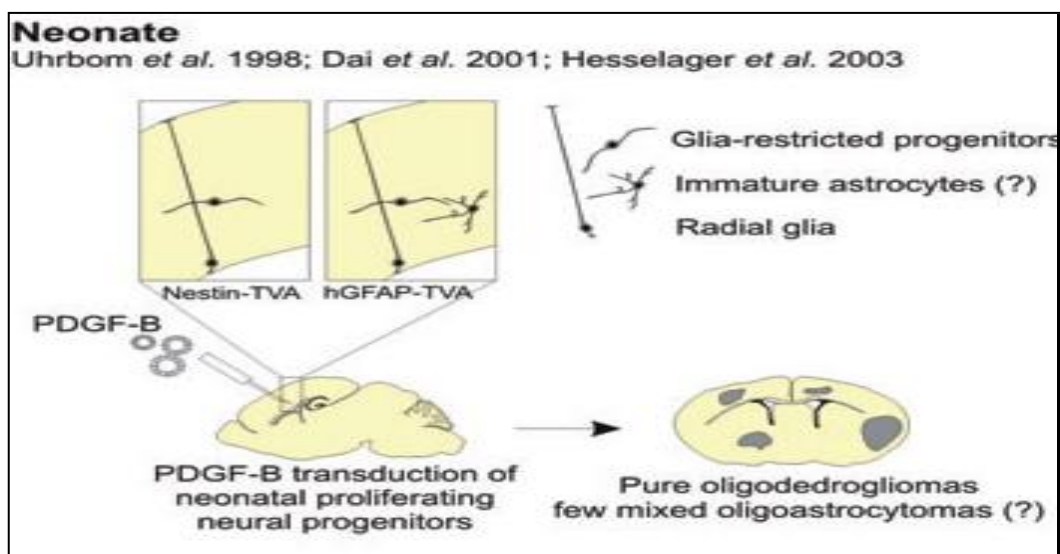
Studi in *Xenopus laevis* hanno portato alla conclusione che la segnalazione del *PDGF* è implicata nella gastrulazione e nella chiusura del tubo neurale (Ataliotis et al. 1995). La gastrulazione comporta una serie di complessi e coordinati movimenti cellulari che danno origine al piano del corpo in tutti i vertebrati. In *Xenopus laevis*, questo processo inizia con l'involuzione di cellule sul lato dorsale dell'embrione. Al fine di valutare il ruolo del *PDGF-A* durante la gastrulazione di *Xenopus*, è stato generato un mutante dominante negativo del suo recettore, *PDGFR*, per interrompere la segnalazione del *PDGF-A* nell'embrione ed è stato dimostrato che il *PDGF* è necessario per un corretta gastrulazione.

## 1.5 Ruolo del *PDGF-B* nello sviluppo dei gliomi

Studi di sovraespressione in vivo del *PDGF-B* – condotti su modello murino – in cellule staminali neurali di topo neonatale hanno mostrato un’induzione, da parte di tale fattore, nella formazione di gliomi (Uhrbom et al. 1998; Dai et al. 2001; Hesselager et al. 2003) (Fig. 1.4)

Questi tumori aggressivi a carico delle cellule gliali, sono classificati dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in base alle loro caratteristiche istopatologiche e alla loro espressione dei marcatori di diverse linee gliali, quali astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi e tumori ependimali. Tuttavia il glioblastoma rappresenta la forma più maligna ed è considerato come lo stadio più avanzato di un astrocitoma (Furnari et al. 2007; Louis et al. 2001).

I gliomi sono ulteriormente suddivisi in classi da I-IV gradi con quest’ultimo che rappresenta il grado più maligno (Louis et al. 2007). Nondimeno questa classificazione basata meramente su criteri istopatologici risulta obsoleta, poiché non tiene in considerazione le nuove informazioni raccolte nell’ambito della biologia dello sviluppo: recenti studi hanno infatti mostrato come la barriera tra le linee cellulari neurali e gliali non sia poi così rigida come si credeva in precedenza; la diversità dei gliomi – rispetto ad altri tipi di tumore – si riflette nel numero di vie di segnalazione distinte che portano alla produzione degli stessi (Furnari et al. 2007; Shih et al. 2006). I tumori che si formano a livello cerebrale normalmente permangono a livello di sistema nervoso centrale e in casi molto isolati possono dare origine a metastasi, cosa che li distingue in maniera marcata da altri tipi di tumori maligni solidi. Esperimenti di trasduzione del *PDGF-B* in cellule progenitrici gliali della sostanza bianca del proencefalo adulto, mostrano una produzione rapida di glioblastomi – con caratteristiche proprie dell’oligodendroglioma – e la medesima cosa avviene se progenitori di oligodendrociti sono trasdotti *ex vivo*, ed in seguito reimpiantati a livello intracranico, confermando quindi l’abilità di tale popolazione cellulare di trasformarsi in seguito al contatto con il *PDGF-B* (Assanah et al. 2006).



**Fig. 1.4:** Primo esperimento, condotto da **Uhrbom e colleghi (1998)**, che ha dimostrato che la sovraespressione in vivo del *PDGF-B* in cellule staminali neurali di topo neonatale induce un'efficiente formazione di gliomi

Tali dati mostrano che i gliomi prodotti in seguito ad una segnalazione aberrante del *PDGF-B* su diversi precursori neurali, portano invariabilmente caratteristiche oligodendrogliali e mancano di caratteristiche proprie degli astrociti (Assanah *et al.* 2006; Dai *et al.* 2001; Jackson *et al.* 2006).

Esistono due spiegazioni distinte, anche se non mutualmente esclusive, che possono fornire una spiegazione a queste osservazioni: in prima istanza, alterazioni nella via di segnalazione del *PDGF-B* possono considerarsi come evento secondario durante lo sviluppo di alcuni astrocitomi. In questo caso, nonostante la sovraespressione del *PDGF-B* non sia direttamente responsabile nel dare luogo ad astrocitomi da cellule staminali neurali adulte, un aumento della sua segnalazione può portare ad una lesione molecolare secondaria vantaggiosa per gliomi astrocitari già avviati; un'altra possibile spiegazione è che gliomi classificati e identificati come astrocitomi facciano parte in realtà di tumori oligodendrogliali a causa di una errata classificazione, dovuta per lo più a difetti nelle valutazioni istopatologiche del tessuto in disamina.

Oligodendrogliomi composti da cellule tumorali marcate con fluorescenza – in topo, come organismo modello – forniscono un forte argomento a favore della seconda ipotesi (Assanah et al. 2006; Calzolari et al. 2008; Appolloni et al. 2009).

Cellule con caratteristiche astrocitiche spesso rappresentano una frazione rilevante delle cellule all'interno del tumore, eppure la capacità di visualizzare le cellule tumorali singole chiarisce che questi sono solo astrociti reclutati e attivati. Per cui, una possibile errata identificazione di alcuni gliomi come astrocitomi ha contribuito alla discrepanza tra le osservazioni fatte nell'uomo e nel modello murino di tumori cerebrali.

Esperimenti più recenti sono stati condotti su una popolazione di cellule progenitrici multipotenti, in particolare cellule gliali radiali del telencefalo embrionale, ottenute mediante iniezioni in utero di vettori retrovirali che esprimevano *PDGF-B*. Nonostante la popolazione di progenitori fosse estremamente eterogenea e in grado di dare luogo e origine a tutte le cellule del SNC (Malatesta et al. 2008), tale metodica ha portato alla formazione di oligodendrogliomi puri: tale analisi ha mostrato un profilo di espressione genica uniforme tra i gliomi indotti dal *PDGF-B* e ha evidenziato una buona somiglianza con i precursori degli oligodendrociti (OPC) se confrontato con quello di un ampio insieme di tipi di cellule neurali; tuttavia tali informazioni non forniscono la prova certa sull'eventuale capacità del *PDGF-B* di decidere il destino delle cellule.

Queste cellule formano una progenie mista gliale e neuronale, ma successivamente al processo di trasduzione danno origine a precursori oligodendrocitici con una frequenza considerevolmente maggiore rispetto a cellule in coltura trasdotte con vettori retrovirali di controllo. La modulazione del destino di tali precursori neurali può considerarsi quindi un processo estremamente rilevante nel corso dell'iniziazione di un glioma da parte del *PDGF-B*.

In diversi tumori, la segnalazione del *PDGF-B* sostiene la crescita del tumore, almeno in parte, promuovendo la creazione e il mantenimento intratumorale di una rete di vasi sanguigni e reclutando componenti cellulari stromali (Dong et al. 2004;

Lokker et al. 2002; Pietras et al. 2008; Shih et al. 2004). Inoltre, le cellule del glioma di solito mostrano una straordinaria attività infiltrativa, una caratteristica fedelmente riprodotta in modelli murini di gliomagenesi indotta dal *PDGF-B*, dove le cellule che sovraesprimono *PDGF-B* migrano estesamente attraverso il cervello in un modo che ricorda l'attività migratoria di cellule progenitrici neurali (Assanah et al. 2006; Calzolari et al. 2008; Appolloni et al. 2009). Infatti, recenti osservazioni hanno suggerito che le cellule del glioma sfruttino il macchinario molecolare utilizzato dai normali progenitori neurali (Beadle et al. 2008; Cayre et al. 2009).

I gliomi di alto grado indotti da quest'ultimo sono in tutto e per tutto dipendenti da esso e non hanno più la capacità di propagare tumori in vivo dopo la perdita della sua sovraespressione (Calzolari et al. 2008); in vitro queste cellule risentono del fenomeno dell'inibizione da contatto mentre quelle sovraespremententi il *PDGF-B* formano foci massicci di cellule (Assanah et al. 2006; Calzolari et al. 2008); un'ulteriore conseguenza della perdita di sovraespressione del *PDGF-B* consiste nella riduzione del potenziale infiltrativo delle cellule costituenti il glioma, che non sono quindi più capaci di infiltrarsi a livello cerebrale in seguito a trapianto intracranico. Ad ogni modo, se in tale popolazione cellulare, viene fatto riesprimere il *PDGF-B* si ristabilisce istantaneamente il potenziale oncogeno di tali cellule; questo indica che tale fattore regola il potenziale oncogeno di cellule trasformate e incide sulla proliferazione del tumore e sulla sua eventuale migrazione. La natura per il momento incurabile dei gliomi, è il risultato della scarsa accessibilità ai trattamenti chirurgici e farmacologici degli stessi ed in parte è dovuta alla loro estrema attività infiltrante, che ne renda praticamente impossibile un'eventuale resezione chirurgica.

Sembra quindi probabile che la segnalazione del *PDGF-B* nel tumore al cervello sia rilevante per l'espansione e la sopravvivenza del tumore, stimoli la proliferazione e, indirettamente, la promozione dei nutrienti da fornire alla massa tumorale (di Tomaso et al. 2009).

Infine, studi sui ligandi *PDGF-C* e *D*, hanno dimostrato che anche loro sono espressi nei gliomi (Lokker et al. 2002). In particolare, si ha la loro espressione in linee cellulari tumorali che in precedenza non avevano rilevato *PDGF-A* o *B*, indicando che il “pathway” del *PDGF* può essere coinvolto in una percentuale maggiore di casi di quelli precedentemente riconosciuti.

## **1.6 La cresta neurale cranica**

L’attivazione dei recettori del *PDGF* provoca fenomeni quali la migrazione e la proliferazione cellulare; studi su organismi modello hanno mostrato come tale famiglia di recettori è necessaria in molte popolazioni di cellule mesenchimali e migratorie durante lo sviluppo embrionale. La popolazione più rappresentativa è costituita da cellule della cresta neurale, capace di produrre le ossa craniche, il mesenchima della testa, i neuroni dei gangli simpatici e la muscolatura liscia (Mayor et al. 2010). In *Xenopus*, il recettore *PDGFR $\alpha$*  è prodotto in tutte le cellule migranti della cresta neurale cefalica e il ligando *PDGF-A* è prodotto – in modo complementare – lungo il percorso della loro migrazione nell’ectoderma neurale, nell’ectoderma epidermico, nella vescicola otica, e nell’endoderma faringeo (Ho et al., 1994). Durante la migrazione attraverso gli archi branchiali, le cellule della cresta neurale continuano a produrre *PDGFR $\alpha$* , mentre l’endoderma faringeo adiacente produce il ligando *PDGF-A* (Ho et al., 1994).

Questa popolazione è composta da cellule pluripotenti altamente specializzate – spesso definite quarto foglietto embrionale – che si originano al confine tra la piastra neurale e l’ectoderma; in stadi successivi tale popolazione va incontro ad un processo comunemente definito transizione epitelio–mesenchimatica necessaria alle cellule per la migrazione. Tali cellule smettono infatti ogni legame con le cellule a loro adiacenti e si spostano fuori dalla lamina epiteliale.

Queste caratteristiche rendono le cellule della cresta neurale cranica un ottimo sistema modello per eventuali studi di motilità cellulare in vivo e soprattutto permettono un’analisi approfondita della transizione epitelio–mesenchimatica,

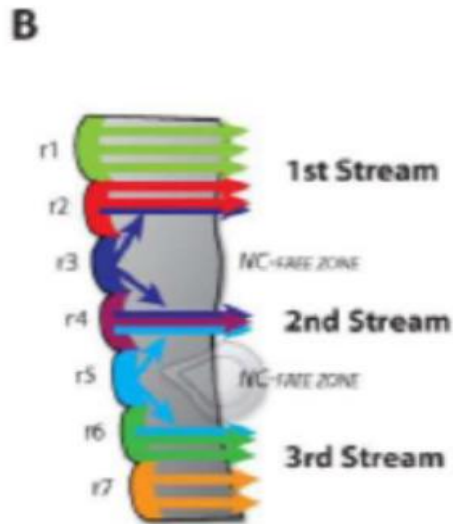
meccanismo presente in molti tumori. Le NCC vanno incontro – durante questo lasso di tempo – a modificazioni di natura citoscheletrica e morfologica che permettono loro di abbandonare il neuroepitelio; migrano grazie all’acquisizione di specifici recettori cellulari, metalloproteinasi e molecole d’adesione necessarie alle interazioni cellula – cellula e ai segnali che l’ambiente circostante invia per influenzare la migrazione.

Una volta giunte a destinazione vanno incontro ad aggregazione durante l’ultima fase di differenziamento, processo orchestrato da una complessa rete di segnalazione che coinvolge molti “pathways” tra i quali si annoverano *Wnt*, *BMP*, *FGFs* e altri fattori di trascrizione.

Sono stati identificati vari geni in grado di conferire un’identità alla cresta neurale. Tra questi si annoverano Sox9, Sox10, FoxD3, Snail2/Slug, c-Myc e AP2 che sono fattori di trascrizione espressi nelle NCC pre-migratorie o durante la migrazione (Meulemans and Bronner- Fraser 2005).

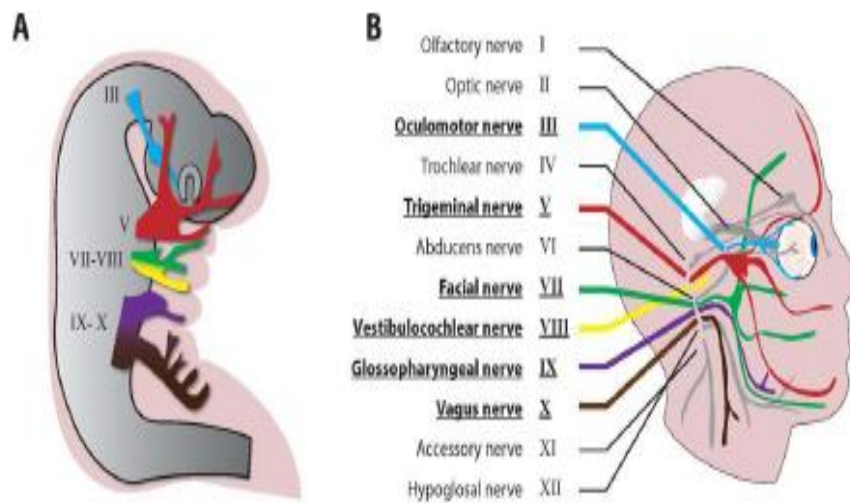
Studi morfologici mostrano che le NCC craniche migrano dalla regione più dorsale del tubo neurale in senso ventrale a livello delle tasche faringee lungo tre “stream” ben distinti: mandibolare, ioideo e branchiale. Le cellule dello “stream” mandibolare hanno origine per la maggior parte nel mesencefalo e dai primi due rombomeri del romboencefalo e vanno incontro a migrazione che le porta attorno all’occhio e a livello della prima tasca faringea, partecipando alla formazione del nervo trigemino, ai tessuti connettivi facciali e agli strati corioidei dell’occhio e della cornea; le cellule dello “stream” ioideo hanno invece origine dal quarto rombomero e migrano nella seconda tasca faringea contribuendo alla formazione dei gangli VII e VIII e mantenendosi vicine al sistema nervoso centrale in via di sviluppo (Hensey and Gautier, 1998); infine lo “stream” branchiale è prodotto a partire da cellule del sesto e settimo rombomero che migrano rispettivamente nella terza e quarta tasca faringea producendo le cartilagini del cestello branchiale (Figura 1.5).





**Fig. 1.5:** Rappresentazione schematica della migrazione delle cellule della cresta neurale (NCC) cefalica in *Xenopus laevis* (Mayor et al. 2010).

Anche se le NCC vengono specificate a livello precoce, quando raggiungono i propri target sono ancora pluripotenti: il loro destino viene specificato a stadi più tardivi a seconda della loro posizione all'interno dell'embrione; c'è infatti una correlazione diretta tra il momento in cui le cellule migrano a partire dal tubo neurale e il loro successivo destino differenziativo. Le NCC craniche differenzieranno quindi dando origine alle cartilagini craniofacciali e contribuiscono alla formazione della muscolatura della testa ed alla formazione dei gangli dei nervi cranici (Noden 1983) (Figura 1.6.).



**Fig. 1.6: A.** Contributo neuronale delle cellule della cresta neurale a strutture del PNS craniche riportate in un embrione di mammifero virtuale. **B.** Distribuzione dei nervi cranici in una testa umana. I nervi che ricevono contributo neuronale dalle creste neurali sono a colori. I nervi che ricevono solo contributo gliale, o nessun contributo da parte delle NC appaiono in grigio (Mayor et al. 2010).

### 1.7 Animal caps in *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis* è utilizzato come animale modello per studiare gli eventi induttivi e l'organogenesi che si verificano durante lo sviluppo dei vertebrati. Dato che gli embrioni di *Xenopus* sono facili da ottenere in quantità elevata e sono relativamente di grandi dimensioni, quest'ultimi sono ottimi esemplari per l'esecuzione di tecniche sperimentali quali microiniezione e microchirurgia. L'animal cap, che rappresenta un'area della blastula attorno al polo animale (Figura 1.6), è destinata a formare l'ectoderma durante il normale sviluppo. Tuttavia, queste cellule, per stadi precoci di sviluppo, mantengono la pluripotenza e se esposte a induttori specifici, possono differenziarsi in tessuti di varia natura quale neurale, mesodermico e endodermico. In questo senso, le cellule dell'animal cap sono

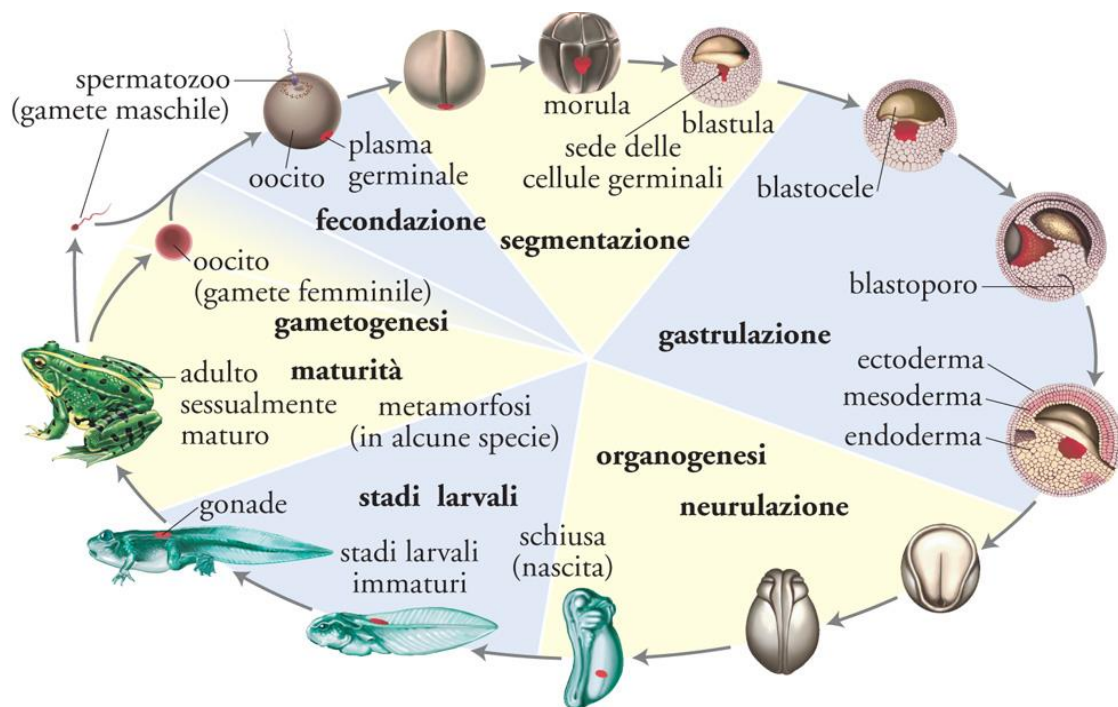
equivalenti alle cellule staminali embrionali di mammifero. L'embrione precoce di anfibio consiste infatti di due diversi tipi di cellule, le cellule pigmentate del polo animale che danno principalmente luogo all'epidermide e al sistema nervoso (Keller et al. 1975; Cooke e Webber, 1985) e le cellule del polo vegetale che daranno principalmente origine alle cellule dell'intestino. Se vengono isolate le cellule del polo animale, le cosiddette cellule dell'animal cap, queste – in assenza di alcuno stimolo – costituiscono solo epidermide differenziata (Holtfreter & Hamburger, 1955; Asashima & Grünz, 1983; lack, 1984; Jones & Woodland, 1986). Se poste invece in condizioni appropriate sono in grado di differenziare in vari tipi di tessuti embrionali (Lan et al. 2009).



**Fig. 1.6:** Produzione di animal caps

## 1.8 *Xenopus laevis* come sistema modello

Per diversi motivi sperimentali – fin dalla fine dell’ottocento – gli studi volti a comprendere i meccanismi di base necessari per lo sviluppo embrionale dei vertebrati sono stati portati avanti negli anfibii. Tali organismi infatti si prestano ottimamente a studi di biologia dello sviluppo per diverse ragioni: lo sviluppo esterno degli embrioni, il rapido sviluppo embrionale, la grande quantità di uova prodotte a partire da un’unica femmina e la possibilità di effettuare esperimenti di guadagno e perdita di funzione mediante microiniezione nell’embrione a stadio di 2 o 4 cellule, rispettivamente di specifici oligonucleotidi antisenso modificati (morpholino), mRNA codificanti per proteine mutanti o delete e mRNA del gene di interesse. Queste caratteristiche rendono *Xenopus laevis* – l’anfibio anuro scelto dal nostro laboratorio – estremamente adatto per studi di biologia molecolare e biologia dello sviluppo (Figura 1.7.).



**Fig. 1.7:** Schema dei principali stadi di sviluppo di *Xenopus laevis* (Wolpert et al.1998)

## 2. SCOPO DELLA TESI

La sovraespressione genica del *PDGF-B* è coinvolta nell'insorgenza dei gliomi, tumori cerebrali gliali. Questo fattore induce la perdita della cosiddetta inibizione da contatto cellulare e favorisce l'infiltrazione e la motilità delle cellule tumorali.

Su queste basi, in collaborazione con il Dott. Paolo Malatesta dell'Istituto Tumori di Genova, nel nostro laboratorio viene affrontato lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti in risposta all'attivazione del sistema di segnalazione mediato dal *PDGF-B*.

A questo scopo sono stati effettuati esperimenti di sovraespressione genica mediante microiniezione del trascritto del *PDGF-B* umano in embrioni di *Xenopus* a stadio di 2 o 4 cellule. I fenotipi ottenuti sono stati analizzati mediante esperimenti di ibridazione *in situ* "whole mount" con specifici markers molecolari (*FoxD3*, *Slug*, *Twist* etc.) per visualizzare il comportamento di diverse sottopopolazioni di cellule delle creste neurali craniche a vari stadi di sviluppo embrionale. Questa popolazione cellulare risulta infatti essere un ottimo sistema modello per studiare eventi di motilità cellulare in vivo in quanto, tali cellule, vanno incontro ad un processo di trasformazione epitelio-mesenchimatica e migrano attivamente durante l'embriogenesi.

Inoltre si è anche cercato di valutare se l'azione del *PDGF-B* fosse in grado – indipendentemente dall'influenza di altri fattori – di indurre formazione di creste neurali: a tale scopo sono stati condotti esperimenti su animal caps, prelevati da embrioni precedentemente microiniettati con RNA messaggero di *PDGF-B* su entrambi i lati. Dagli animal cap si è estratto quindi l'RNA, si è retrotrascritto a cDNA che è stato poi utilizzando per saggi di PCR al fine di valutare la presenza di eventuali marcatori specifici per le creste neurali.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. Digestione di plasmidi con enzimi di restrizione

Per ottenere DNA stampo lineari, necessari per effettuare trascrizioni in vitro, si utilizzano enzimi di restrizione che tagliano nel plasmide, non nell'inserto. Vengono usati preferibilmente enzimi che lasciano un'estremità al 5' protrudente o "blunt"; si evita così che l'RNA venga trascritto a partire dal filamento complementare a quello desiderato, cosa che può succedere usando un DNA stampo con estremità 3' sporgente. Le digestioni vengono generalmente effettuate in un volume finale di 50 µl. La miscela di reazione è costituita dal DNA plasmidico, dall'enzima di restrizione, presente in concentrazione di 1-2 Unità Enzimatiche (UE) per µg di plasmide e dal tampone specifico per il tipo di enzima utilizzato. Occorre che il volume di enzima aggiunto, non superi 1/10 del volume della miscela di reazione, poiché un'eccessiva concentrazione di glicerolo, in cui gli enzimi sono conservati, può interferire con la cinetica di reazione.

La reazione di digestione viene fatta procedere per una o più ore, in base alla quantità di DNA che deve essere digerito. In genere sono sufficienti 1-3 ore di incubazione a una temperatura che può variare a seconda del tipo di enzima di restrizione. Al fine di verificare se la digestione è completa si carica su gel di agarosio all'1%, colorato con bromuro di etidio, 1/20 della miscela di reazione accanto ad un'aliquota di plasmide non digerito. Se la digestione, linearizzazione, è completa avremo una banda unica che teoricamente dovrebbe migrare più lentamente rispetto al superavvolto circolare. Se la digestione del DNA ha avuto successo si procede con l'estrazione fenolica.

## **3.2. Purificazione del DNA**

### **3.2.1. Estrazione fenolica**

Per purificare il DNA dalle proteine, si porta la miscela di digestione ad un volume di 150 µl con acqua e si aggiunge un uguale volume di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico, soluzione 25:24:1 a pH 8. Dopo aver mescolato energicamente, si centrifuga per 3 minuti a 12000 RPM. Si ottengono due fasi, una organica contenente le proteine ed una acquosa contenente il DNA. Si prende il sovranatante acquoso e si mette in una provetta pulita.

Questa tecnica si basa sul fatto che le proteine sono più solubili in fase organica che in fase acquosa: fenolo e cloroformio denaturano le proteine, il cloroformio facilita la separazione delle fasi mentre l'alcool isoamilico riduce la formazione di schiuma durante l'estrazione.

Procediamo quindi con la precipitazione alcolica.

### **3.2.2. Precipitazione alcolica**

Il DNA viene precipitato, aggiungendo al prodotto dell'estrazione fenolica 2.5 volumi di EtOH assoluto e 1/10 di volume di Sodio Acetato (pH 5.2, 0.3M finale), questi sali facilitano la precipitazione e assorbono l'acqua che idrata il DNA, proteggendolo dal congelamento.

Dopo aver mescolato, capovolgendo il tubo diverse volte, si mette il tutto a precipitare 30 min. a -80°C oppure 4 ore a -20°C. Quindi si centrifuga per 15 minuti a 12000 rpm a 4° C, si versa il sovranatante e si lava il "pellet" dai sali con EtOH al 70% freddo. Una volta che il "pellet" è asciugato, si sospende il DNA in acqua sterile e si conserva a -20°C. Per stimare la concentrazione di linearizzato, si prende un volume di DNA che presumiamo corrispondere a circa 200/300 ng di DNA, supposto un recupero medio dell'80% dall'estrazione fenolica, e lo si carica su gel di agarosio per verificarne la quantità reale.

### 3.3 Embrioni di *Xenopus laevis*

Gli embrioni di *Xenopus laevis* sono ottenuti mediante fecondazione in vitro: il maschio viene anestetizzato mediante immersione in una soluzione allo 0,1% di MS222 (metansulfonato dell'estere etilico dell'acido 3-aminobenzoico), e poi successivamente lavato accuratamente sotto acqua di rubinetto, prima di essere operato per la rimozione dei testicoli. Il testicolo può essere anche conservato per qualche giorno a 4°C in MMR 1X, NaCl 20 mM e gentamicina e venire quindi usato per più esperimenti.

Le femmine di *Xenopus laevis* vengono stimulate con 100 UI di gonadotropina sierica per uso veterinario, da 4 a 11 giorni prima della deposizione e con 800/1000 UI di gonadotropina corionica 10-12 ore prima della deposizione. Le gonadotropine vengono somministrate per iniezione nel sacco perilinfatico. Le femmine vengono indotte a deporre esercitando manualmente una pressione sul loro addome. Le uova vengono quindi raccolte in piastre Petri, contenenti MMR 0,1X. A questo punto si elimina dalle piastre l'MMR 0,1X e si effettua la fecondazione passando, per circa 2, 3 minuti, un frammento di testicolo sopra le uova che vengono poi lasciate a secco per 5 minuti. Si aggiunge poi di nuovo MMR 0,1X. La raccolta delle uova può essere fatta ripetutamente ad intervalli di 2 ore. Dopo almeno 25 minuti dalla fecondazione, gli embrioni vengono privati del loro rivestimento gelatinoso (gellycoat), mediante un trattamento con soluzione degellificante (dejelling), seguito da un accurato lavaggio in soluzione di MMR 0,1X. Gli embrioni vengono lasciati sviluppare in tale soluzione fino allo stadio opportuno; in caso di microiniezione, tali embrioni vengono presi allo stadio di 2 o 4 cellule. Nel caso si debbano raccogliere embrioni da processare in esperimenti di ibridazione in situ "whole mount" è necessario asportare manualmente anche la membrana vitellina e questo viene effettuato mediante l'ausilio di pinzette Dumont n°5.

Gli stadi embrionali richiesti sono stati identificati secondo i criteri di Nieuwkoop e Faber (1967). Gli embrioni da conservare o da sottoporre a ibridazione in situ "whole mount", vengono fissati in "vials" di vetro da 7 ml, contenenti MEMFA. La



fissazione viene fatta durare per 1 ora a T ambiente, trascorsa la quale la soluzione di MEMFA viene rimossa e sostituita con EtOH assoluto, che consente di conservare gli embrioni per mesi alla temperatura di -20°C.

### *Soluzioni*

#### **MMR**

NaCl 0,1 mM 0o

KCl 2 mM

MgSO<sub>4</sub> 1 mM

CaCl<sub>2</sub> 2 mM

HEPES 5 mM ph 7,8

EDTA 0,1 mM

#### **Dejelling solution**

DTT 3,2 mM

Tris-HCl 0,2 M pH 8,8

#### **MEMFA 1X (Stock 10X)**

MOPS 0,1 M pH 7,4

EDTA 2 mM

MGSO<sub>4</sub> 1 mM

Formaldeide 3,7%

### 3.4 Microiniezione

#### 3.4.1 Microiniezione in embrioni di *Xenopus laevis*

Gli embrioni di *Xenopus laevis* sono pigmentati: ciò permette di distinguere, allo stadio di 2-4-8 cellule, il polo animale da quello vegetativo e i blastomeri dorsali da quelli ventrali. Al momento della microiniezione, si trasferiscono gli embrioni, degellificati, in una piastra Petri alla quale è fissata, sul fondo, una reticella di plastica con maglie di circa 1 mm. La reticella limita gli spostamenti degli embrioni durante la microiniezione. Gli embrioni sono immersi in una soluzione contenente 0.1X MMR e Ficoll 3%; il Ficoll è vischioso e permette agli embrioni di mantenere la forma sferica durante la fase di iniezione. Gli embrioni microiniettati sono lasciati sviluppare in 0.1X MMR - 3% Ficoll nelle prime ore dopo l'iniezione e poi trasferiti in 0.1X MMR.

Quando gli embrioni di controllo, non iniettati, raggiungono lo stadio desiderato, si fissano controlli ed iniettati e si conservano a -20°C. Le microiniezioni sono state eseguite con un microiniettore Eppendorf FemtoJet, che consente l'iniezione di volumi molto piccoli di liquido (nl). Gli aghi impiegati sono aghi Eppendorf Femtotips II che hanno un diametro esterno di 0.7 µm e un diametro interno di 0.5 µm. Il caricamento dell'RNA da microiniettare può essere eseguito con una micropipetta Gilson direttamente nell'ago stesso prima che questo venga montato sul microiniettore.

Gli embrioni possono essere iniettati allo stadio di 2-4 cellule: nel caso in cui vengano eseguiti esperimenti di ibridazione in situ "whole mount", è possibile iniettare gli embrioni allo stadio di 2 blastomeri, solo su un lato dell'embrione (1/2), o allo stadio di 4 cellule, nel blastomero più piccolo e più pigmentato (1/4); nel caso invece in cui vengano eseguiti animal cap assay, la microiniezione deve essere condotta in entrambi i blastomeri allo stadio di 2 cellule (2/2). Su tali embrioni così iniettati viene condotto successivamente condotto uno screening per la GFP, irradiando l'embrione con una luce UV nella frequenza desiderata.

### 3.4.2 Sintesi in vitro dei trascritti da microiniettare

Quando si preparano trascritti da microiniettare, si pone il problema sia della stabilità del trascritto che dell'efficienza della traduzione all'interno della cellula. Per ovviare a questi problemi si inserisce il cDNA dei geni da iniettare all'interno di plasmidi che contengono elementi stabilizzanti l'RNA. Inoltre, per aumentare l'efficienza di traduzione, si aggiunge alla miscela di trascrizione una "terminal CAP structure" (CAP) all'estremità 5'. In questo modo si possono ottenere trascritti stabili, in grado di sopravvivere all'interno della cellula. Il "CAP", tipico di molti RNA cellulari, consiste di una 7-metil-guanosina 5' trifosfato, che si lega mediante un ponte fosfodiesterico 5'-5' all'RNA trascritto in vitro, rallentandone la degradazione in ambiente cellulare. Per ottenere trascritti forniti di "CAP" è sufficiente far avvenire la reazione di trascrizione in presenza di una concentrazione di GTP pari a 1/10 di quella del "CAP", la cui concentrazione eguaglia quella di ATP, UTP e CTP. I templati vengono di norma preparati linearizzando per digestione 5-10 µg di DNA plasmidico, usando un sito di restrizione a valle della coda di poli-A o del sito di poliadenilazione virale. La reazione di trascrizione viene generalmente condotta in 20 µl.

#### **Esempio:**

DNA linearizzato	1-2 µg
Mix "CAP" 5X	4 µl
RNA-polimerasi	2 µl (50-100 UE)
Rnase-Inhibitor	1 µl (20 UE)
H2O RF fino a	20 µl

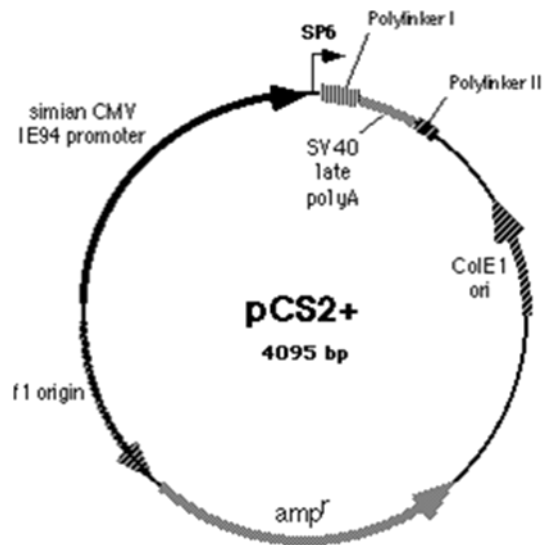
La reazione è condotta a 37°C per 2 ore, trascorse le quali, il DNA stampo viene idrolizzato, mediante incubazione sempre a 37°C per 1 ora con Dnasi I RF. Seguono estrazione con TNES e fenolo-cloroformio, precipitazione alcolica, risospensione in TE RF o H<sub>2</sub>O RF e stima di quantità su gel di agarosio con l'ausilio di "markers" a pesi molecolari noti.

I trascritti vengono poi diluiti, suddivisi in varie aliquote e conservati a -20°C, questo permette di scongelare la sola quantità necessaria durante la microiniezione.

Per la produzione del trascritto codificante per la GFP (di cui si sono iniettati 300 pg in ogni embrione) è stato utilizzato un vettore commerciale. Nella maggior parte degli esperimenti di microiniezione insieme al trascritto di interesse abbiamo iniettato il messaggero per la GFP. Questo metodo ci permette di individuare facilmente il lato iniettato da quello di controllo irradiando l'embrione con una luce nella frequenza desiderata. La distinzione tra il lato iniettato e di controllo viene fatta sull'embrione vivo.

Dopo aver selezionato gli embrioni, una volta che questi raggiungono lo stadio desiderato vengono fissati in MEMFA o in PFA 4% per 1 ora e 15 minuti e si disidratano in etanolo (EtOH).

Gli embrioni in EtOH 100% possono essere conservati a -20°C.



**Fig. 3.1:** Vettore plasmidico pCS2+

### 3.4.3 Trascritti microiniettati

Il messaggero codificante per il *PDGF-B* umano (hPDGF) è stato microiniettato a varie dosi fino ad arrivare a stabilire la concentrazione ottimale di 150 pg per ogni embrione. La porzione codificante del gene LacZ unita ad un segnale di localizzazione nucleare ed inserita in pCS2+ ci è stata fornita dal Prof. I. Dawid. Il messaggero è coiniettato con il *PDGF-B* e la dose iniettata in ogni embrione è 300 pg. Il gene per la Green Fluorescent Protein (GFP) è inserito nel vettore pCS2+. La dose iniettata in ogni embrione è di 300 pg.

## 3.5 Reazione cromogenica per la galattosidasi

Nella maggior parte degli esperimenti di microiniezione insieme al trascritto di interesse abbiamo iniettato il messaggero per la  $\beta$ -galattosidasi (citoplasmatica o nucleare). Questo metodo ci permette di individuare facilmente il lato iniettato da quello di controllo attraverso una reazione enzimatica il cui prodotto è colorato.

Esistono diversi substrati per la  $\beta$ -galattosidasi, ad esempio il Salmon-gal il cui prodotto è di colore rosato, l'X-gal, di colore celeste e il Red-gal, di colore rosso.

Quando gli embrioni hanno raggiunto lo stadio desiderato, vengono fissati in MEMFA per 40 minuti e lavati per 5 minuti in PBS 1X; si aggiunge poi la soluzione con il substrato, " $\beta$ -gal solution", e si incuba in stufa a 37°C fino a quando gli embrioni sono sufficientemente colorati. E' importante controllare spesso la reazione di colorazione poiché la durata di questa fase è variabile (da 15 min a 1h). Per interrompere la reazione cromogenica, si passano gli embrioni in PBS 1X per qualche minuto, infine, si fissano nuovamente in MEMFA per 20 min e si disidratano in etanolo (EtOH). Gli embrioni in EtOH 100% possono essere conservati a -20°C o utilizzati direttamente per ibridazione *in situ* "whole mount".

*Soluzioni:*

**PBS 10X (pH 7.3)**

NaCl	1.37 M
KCl	0.027 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.043 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.015 M

**$\beta$ -gal solution (10 ml)**

C <sub>6</sub> FeK <sub>3</sub> N <sub>6</sub>	32.93 mg
C <sub>6</sub> FeK <sub>4</sub> N <sub>6</sub> • 3H <sub>2</sub> O	42.24 mg
X-gal o Red-gal (20 $\mu$ g/ $\mu$ l )	400 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	20 $\mu$ l
PBS fino a vol.	

### 3.6 Ibridazione in situ

#### 3.6.1 Preparazione della sonda

Per preparare una sonda a RNA è necessario digerire il plasmide contenente il cDNA del gene di interesse con un enzima di restrizione che tagli una sola volta nel plasmide in un punto posto al 5' del gene e che non tagli nel gene stesso in modo da ottenere un frammento di DNA lineare. Dopo la digestione il DNA viene purificato mediante estrazione fenolica e poi utilizzato come stampo in una reazione di trascrizione in vitro con la polimerasi che riconosce il promotore posto al 3' del gene, in modo da ottenere un trascritto antisenso. Si effettua una reazione di trascrizione standard (Melton et al. 1985) usando Sp6, T7 o T3 RNA polimerasi, aggiungendo alla miscela di reazione un UTP ribonucleotide, sostituito in posizione 11, con digossigenina. La miscela di reazione viene preparata aggiungendo i reagenti a temperatura ambiente.

#### *Cloni usati per l'ibridazione in situ:*

Probe	Plasmide	Linearizzato con	Trascritto con
<i>EphB1</i>	pBSKS	EcoRI	T7
<i>EphrinB2</i>	pBSKS	Xba I	T3
<i>FoxD3</i>	pBSC	EcoRI	T7
Sox2	pGEM-T Easy	NcoI	Sp6
K81	pCMV-Sport6	SalI	T7
<i>Slug</i>	sp72	EcoRV	Sp6
<i>Twist</i>	pCR 2.1-TOPO	Hind III	T7

Dopo l'incubazione a 37°C per 2 ore si procede con la precipitazione alcolica, si aggiungono quindi 2 µl di litio cloruro 5M e 75 µl di EtOH assoluto. Dopo aver mescolato, capovolgendo il tubo diverse volte, si mette il tutto a precipitare a -20°C, per almeno 4 ore, oppure, a -80°C per 1 ora. A questo punto si centrifuga a 12000 rpm a 4°C, per 20 minuti; poi, eliminato il sovrantante, si aggiungono al pellet 150 µl di EtOH 70% pre-raffreddato e si centrifuga a 12000 rpm a 4°C, per 5-10 min. Si libera, infine, il pellet da tutto l'etanolo residuo, lasciandolo evaporare all'aria a temperatura ambiente e si risospende in 20 µl di H<sub>2</sub>O RF (oppure TE pH

7.5 RF). La stima della quantità del trascritto ottenuto viene effettuata su gel di agarosio, servendosi dell'ausilio di tRNA a concentrazione nota, come "marker" di quantità. I trascritti possono essere conservati in "stock" 10X (10 µg/ml) nella miscela di ibridazione.

### **3.6.2 Ibridazione in situ "whole mount"**

Per saggiare il normale "pattern" di espressione di un gene e per analizzare l'effetto della sovraespressione, o della perdita di funzione, di un gene su un altro gene, putativo "target", si utilizza la tecnica di ibridazione *in situ* "whole mount". Gli esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni interi di *Xenopus laevis* sono stati effettuati, fatta eccezione per alcune modifiche, seguendo il protocollo di R. Harland (1991). L'ibridazione viene realizzata in tubi "vials" di vetro e gli embrioni vengono mantenuti nelle "vials" per tutta la durata dell'esperimento. Tutti i passaggi, se non diversamente indicato, sono eseguiti sistemando i "vials" orizzontalmente su un agitatore, aggiungendo e rimuovendo ogni volta 5 ml circa di soluzione. Gli embrioni vengono prima reidratati, effettuando lavaggi di 5 min. ciascuno, in una serie decrescente di alcoli:

EtOH 100%

EtOH 75% + H<sub>2</sub>O 25%



EtOH 50% + H<sub>2</sub>O 50%

EtOH 30% in PBS 1X

PBT 100% per 3 volte

Segue trattamento in una soluzione di 10 µg/ml di proteinasi K in PBT e si incuba, a T ambiente, per 5-20 minuti, senza agitazione; il tempo di incubazione in proteinasi K (PK) varia a seconda dello stadio degli embrioni da analizzare. Bisogna prestare molta attenzione a questo passaggio essendo gli embrioni molto sensibili a sfaldamento, ad opera della PK.

Seguono 2 lavaggi di 5 min. ciascuno in PBT. Gli embrioni vengono quindi rifissati 20 min. in 4% paraformaldeide (4 ml di PBS 1X + 1 ml di 20% paraformaldeide) a T ambiente sull'agitatore. Seguono 3 lavaggi in PBT, di 5 min ciascuno. Si rimuove quindi il PBT da ogni tubo e lo si sostituisce con 600 µl di PBT e 250 µl di miscela di ibridazione, disponendo i tubi sull'agitatore verticalmente per circa 10 minuti: questo passaggio è necessario per abituare gli embrioni alla nuova densità della miscela di ibridazione. Il passaggio successivo prevede il trattamento degli embrioni con la sola miscela di ibridazione per 4-6 ore a 62 °C. Si sostituisce, infine, con 0.5 ml di tampone di ibridazione addizionato con la sonda marcata alla concentrazione finale di 0.3 µg/ml e si ibrida a 62°C per almeno 12 ore. Una volta rimosso, il tampone di ibridazione contenente la/le sonda/e può essere conservato e riutilizzato fino a due/tre volte. A questo punto è necessario lavare l'eccesso di sonda non ibridata o ibridata in maniera aspecifica; si fanno a tale scopo lavaggi in soluzioni a forza ionica decrescente, per aumentarne la stringenza, tenendo presente che è importante aggiungere le soluzioni preriscaldate alla temperatura del lavaggio corrispondente. Si sostituisce con 1 ml di tampone di ibridazione fresco e si incuba a 62°C per 10 min. Seguono 3 lavaggi in 2x SSC e chaps 0.1% a 62°C di 20 min ciascuno e due volte in 0.2x SSC e chaps 0,1% a 62°C, per 30 minuti. Prima di

iniziare la procedura di incubazione con anticorpo, si lava due volte in MABT a T ambiente per 10-15 minuti.

Segue una preincubazione di 1 ora a T ambiente in 0.5 ml di MABT + reagente bloccante 2% + siero di pecora 20%. Si incuba per 4 ore a temperatura ambiente o per tutta la notte a 4°C con anticorpo opportuno, diluito in una soluzione di MABT + reagente bloccante 2% + siero di pecora 20%. Per rimuovere l'eccesso di anticorpo dagli embrioni si compiono almeno 5 lavaggi con MABT a T ambiente di 60 minuti ciascuno, uno dei lavaggi è preferibile farlo o/n a 4°C. L'ultimo lavaggio viene sostituito con il tampone per la fosfatasi alcalina (APB) + tween 0,1% + Levamisole (una sostanza in grado di inibire le fosfatasi endogene). Si aggiunge infine la soluzione di rivelazione più opportuna. In questo lavoro il substrato della fosfatasi alcalina utilizzato è il "BM purple" che si trova in forma liquida pronta per l'utilizzo e porta ad una colorazione blu intenso. In questa fase la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo scinde il substrato cromogenico (BM purple) generando un prodotto colorato che rende possibile evidenziare le zone in cui la sonda si è ibridata e dove il gene in esame è espresso. Si usano 0.5-1 ml per "vial" a T ambiente fino a quando la colorazione è soddisfacente (da 1 ora a 7 giorni). La reazione deve avvenire al buio così i tubi possono essere ricoperti da un foglio di alluminio. Per osservare la colorazione, gli embrioni possono essere posti in una piastra Petri contenente il tampone per la fosfatasi alcalina.

Se il segnale è insoddisfacente si ripongono gli embrioni nella soluzione di colorazione, altrimenti si procede bloccando la reazione cromogenica rimuovendo il tampone per la fosfatasi alcalina e fissando o/n con MEMFA per stabilizzare la colorazione. Gli embrioni così fissati possono essere conservati in EtOH a -20°C.

*Soluzioni:*

**PBT**

PBS 1X

Tween-20 0.1%

### **Soluzione di paraformaldeide**

Si può preparare uno “stock” di paraformaldeide al 20%, che si conserva in frigo a 4°C per diversi mesi. Si scioglie la paraformaldeide in acqua RF ad una temperatura di 60°C e si chiarifica aggiungendo 10WI di NaOH 10N in 100 ml di paraformaldeide. Quando la soluzione è diventata limpida si lascia raffreddare, si porta a volume con acqua distillata e si filtra con carta 3MM. Al momento dell’uso si diluisce la paraformaldeide così preparata con PBS.

### **Tampone di ibridazione**

Formammide 50%

SSC 5X

Torula RNA 1mg/ml

Eparina 100 µg/ml

Denhart’s 1X

Tween-20 0.1%

CHAPS 0.1%

EDTA 10 mM

### **MAB (Maleic Acid Buffer) pH 7.5**

Acido Maleico 100 mM

NaCl 150 mM

MABT MAB 1X

TWEEN-20 0,1%

### **SSC 20x (concentrazione stock)**

Per 1 litro di soluzione:

NaCl 175,3 g

Na<sub>3</sub>Citrato 88,2 g

### **Tampone di reazione cromogenica della fosfatasi alcalina (APB)**

Tris 100 mM pH 9.5

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

NaCl 100 mM

### **3.6.3 Depigmentazione (“Bleaching”)**

Nell'ibridazione *in situ* “whole mount” abbiamo processato embrioni pigmentati; in questi casi è possibile eliminare il pigmento, in poco tempo, con perdita minima di segnale. A questo scopo è necessario lavare gli embrioni diverse volte in EtOH al 70%, questo serve a rimuovere eventuali reagenti che potrebbero interferire con la reazione di “bleaching”.

Si passano, successivamente, per qualche minuto in una soluzione contenente 0.5X SSC ed EtOH 50% che si sostituisce con 0.5X SSC, 5% formammide, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gli embrioni vengono posti su un agitatore, sotto una lampada a luce fluorescente, per un periodo variabile di 1-2 ore. Quando gli embrioni si sono chiarificati a sufficienza, si rimuove la soluzione contenente acqua ossigenata, per passare gli embrioni in EtOH assoluto e conservarli a -20 °C.

### 3.7 Animal Caps Assay

#### 3.7.1 Produzione Animal Caps

*Xenopus* si presta molto bene a saggi induttivi di vario tipo, tra cui l'“animal caps assay”.

Il saggio degli animal caps (Yamada and Takata, 1961) consiste nell'espianco della calotta animale che costituisce il tetto del blastocele nell'embrione allo stadio di blastula tardiva. Tale espianco è composto da pochi strati di cellule ectodermiche destinate a svilupparsi in epidermide e tessuto nervoso durante lo sviluppo.

Per testare un eventuale effetto di induzione sugli animal cap è possibile aggiungere le proteine ricombinanti in studio alla soluzione isotonica, o in alternativa microiniettare un mRNA di sintesi (codificante per la stessa proteina) nell'embrione a stadio di due o quattro cellule, come esplicito in precedenza. Il saggio viene anche effettuato su embrioni non iniettati, che vengono utilizzati come controllo.

Il primo “step” che deve essere effettuato è la rimozione della membrana vitellina dagli embrioni tramite l'utilizzo di pinzette. Questo può essere tranquillamente fatto facendo un piccolo foro nel polo vegetativo dell'embrione con una pinzetta, mentre con l'altra si “strappa via” letteralmente tale involucro. A questo punto si posiziona l'embrione in modo tale che il polo animale sia rivolto verso l'altro e si taglia con entrambe le pinzette una porzione di tessuto di circa 3x3 mm<sup>2</sup>, che corrisponde all'animal cap. Nello svolgere tale procedura bisogna essere particolarmente attenti a non isolare anche il mesoderma sottostante.

Le porzioni di tessuto così prodotte vengono quindi lasciate nella piastra Petri, in presenza di MBS 1X, soluzione contenente Ca<sup>2+</sup>, necessario per la chiusura di tali animal caps nella loro tipica forma sferica.

I caps prodotti da embrioni microiniettati, vengono successivamente screenati per la GFP al microscopio a fluorescenza; tale marcatura ci permette di selezionare solo gli animal caps che hanno effettivamente preso il trascritto.

Lo sviluppo di quest'ultimi viene seguito valutando lo sviluppo di embrioni "spia" iniettati con il medesimo trascritto: quando gli animal caps giungono alla stadio voluto, vengono congelati in eppendorf 1,5 ml, privandoli dell'MBS residuo, e ponendoli in congelatore a -80 °C o in ghiaccio secco.

*Soluzioni:*

**MBS (Modified Barth's Solution)**

NaCl      88 mM

KCl      1.0 mM

NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mM

HEPES, pH 7.6 10 mM

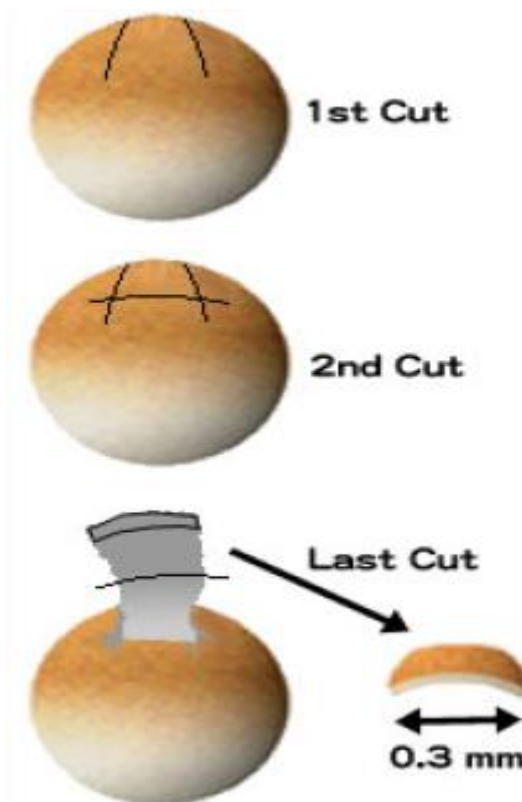
CaCl<sub>2</sub>    0.41 mM

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33 mM

MgSO<sub>4</sub>    0,82 mM

Sodium pyruvate 2.5 mM

Gentamicina 0.02 mg/ml



**Fig. 3.2:** Animal cap assay

#### **3.7.2.1 Estrazione di RNA totale da caps iniettati e caps di controllo**

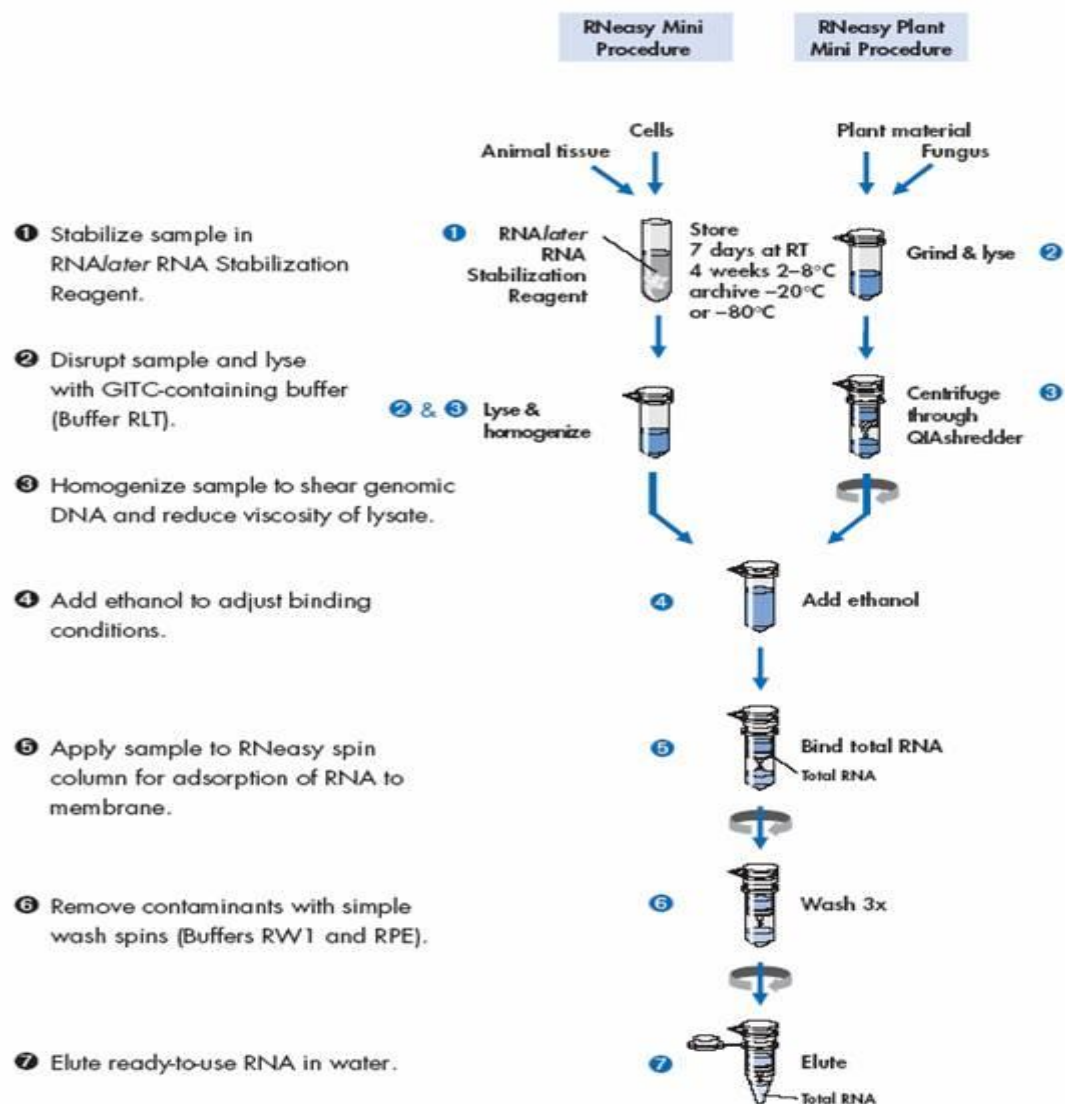
L'estrazione dell'RNA è stata condotta utilizzando l'RNeasy Mini Kit (QIAGEN), sia su "caps" iniettati, sia su "caps" di controllo; ai campioni – stoccati precedentemente a -80 °C – si è aggiunto un Buffer di lisi RLT, che serve per l'omogeneizzazione e la disaggregazione dei tessuti, completata da un successivo passaggio in vortex. E' seguita una centrifugazione per 3 min. a massima velocità: tale processo permette di separare il sovrnatante – che contiene appunto l'RNA totale dei caps – dal pellet, contenente prodotti di scarto; il sovrnatante è stato quindi trasferito in una nuova eppendorf e si è aggiunto un volume di EtOH al 70%.

A questo punto, il campione è stato trasferito in toto su una apposita colonnina (sotto "collection tube") e si è eseguita una centrifugazione di 15 secondi a 10000

RPM; successivamente è stato scaricato l'eluato e si è aggiunto alla colonna un volume di Buffer di lavaggio RW1 ed è stata effettuata un'altra centrifugazione di 15 secondi a 10000 RPM. Sono seguiti due passaggi in Buffer di lavaggio RPE con annesse centrifugazioni (il secondo passaggio prevede una centrifugazione di 2 min. a 10000 RPM). A questo punto la colonnina è stata posta in un nuovo "collection tube" e sono stati aggiunti 30 µl di Rnase free-water direttamente sulla membrana; è stata infine svolta una nuova centrifugazione di 1 min. a 10000 RPM per eluire l'RNA (Fig 3.3).

La quantificazione del trascritto è stata espletata tramite corsa su gel d'agarosio (1 µl campione, 1µl loading buffer 6X, 4 µl H<sub>2</sub>O) in concomitanza con un t-RNA a concentrazione definita (400 ng/µl), o attraverso l'utilizzo di capillari allo spettrofotometro.





**Fig. 3.3:** Procedura di estrazione RNA

### 3.7.2.2 Trattamento con DNAsi e precipitazione

Per evitare eventuali contaminazioni da DNA genomico, in seguito all'estrazione su colonna, è stato realizzato un trattamento successivo con DNAsi (Promega); per ogni  $\mu\text{g}$  (1 $\gamma$ ) di RNA ottenuto – quantificato in precedenza – si è aggiunto al campione 1  $\mu\text{l}$  di enzima, in presenza di un opportuno buffer; il campione è stato incubato quindi a 37 °C per 30 min.

A questo punto, è stata effettuata la precipitazione dell'RNA in EtOH 100% e LiCl 5 M (a volume con H<sub>2</sub>O); il campione così trattato è stato "vortexato" e posto per 30 min. a -80 °C per favorire la precipitazione. Sono seguite due centrifugazioni a 4 °C a 11000 RPM, intervallate da un lavaggio con EtOH 70% freddo.

Il pellet ottenuto è stato asciugato e privato da ogni possibile residuo di etanolo rimasto ed è stato risospeso in un volume di RNAsi free-water appropriato (20 µl).

### **3.7.3 "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction" (RT-PCR)**

La RT-PCR è una tecnica che consente di amplificare un cDNA partendo da RNA totale estratto da cellule e prevede una prima fase di retrotrascrizione dell'RNA messaggero (mRNA) a cDNA e una seconda fase di amplificazione del gene d'interesse dal cDNA ottenuto nella prima fase.

Incubando l'RNA totale con l'enzima trascrittasi inversa, i deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), la soluzione tampone, gli ioni bivalenti Mg<sup>2+</sup> e l'innesco oligo(dT) complementare alla coda di poli-A presente all'estremità 3'-OH dell'mRNA in seguito alla maturazione, è possibile dare il via alla formazione di un filamento di cDNA (DNA copia o complementare). La reazione è condotta in un volume totale di 20 µl.

#### ***Esempio:***

ImProm-II 5X Buffer 4 µl

MgCl<sub>2</sub> 2.4 µl

dNTP mix (10 mM each dNTP) 1 µl

Inibitore RNasi 1u/µl 0,5 µl

Reverse Transcriptase 1 µl

RNA template up to 1 µg

Oligo(dT) 1 µl

H<sub>2</sub>O a volume

#### **3.7.4 “Polymerase chain reaction” (PCR) per marcatori specifici**

Il cDNA generato viene amplificato tramite la metodica di PCR standard attraverso l'utilizzo di primers specifici.

La reazione viene generalmente condotta in un volume finale di 25 µl. La miscela di reazione è costituita dal DNA stampo da amplificare, da una quantità opportuna di desossiribonucleosidi trifosfati (dNTP), appropriati "inneschi" (primers) costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 5' dei due filamenti del segmento da riprodurre, una DNA polimerasi termo-resistente, e un Buffer che serve a mantenere il pH stabile (tampone) e necessario per costituire l'ambiente adatto alla reazione.

##### ***Esempio:***

Buffer Green 5X 5 µl

DNA stampo 2 µl

Primer S 0,8 µl

Primer AS 0,8 µl

dNTPs 0,5 µl

Go-Taq 0,125 µl

H<sub>2</sub>O a volume

I “primers” utilizzati (TWIST, BRA, ODC), dopo opportuna progettazione, sono stati ordinati alla ditta Primm srl.

I primer per amplificare TWIST sono stati:

S: TGCAGAGTCAGAGGGTCATGG

AS: CCAACATTCTTCGTCAAAGTCC

I primer per amplificare BRA sono stati:

S: TATATCCACCCAGACTCACCC

AS: GATAGAGAGAGAGGTGCCCCG

I primer per amplificare ODC sono stati:

S: GTCAATGATGGAGTGTATGGATC

AS: TCCATTCCGCTCTCCTGAGCAC

La Temperatura di melting ( $T_m$ ) è stata calcolata semplicemente considerando 2 °C per il numero di A e di T che compaiono nella sequenza e 4 °C per le G e C

$$T_m = 2\text{ °C (A+T)} + 4\text{ °C (G+C)}$$

Per l’amplificazione è stata usata una  $T_m = 55\text{°C}$  e sono stati fatti 35 cicli di reazione.

### 3.8 Elettroforesi su gel d'agarosio

Al fine di verificare la purezza dei trascritti, il grado di completezza raggiunto dalla digestione del DNA, nonché di stimare la concentrazione del RNA nelle preparazioni e la lunghezza in paia di basi degli acidi nucleici, si prepara un gel di agarosio allo 1% (peso/volume).

I gel sono preparati sciogliendo l'agarosio in TBE, portato alla temperatura di ebollizione. Prima che il gel polimerizzi si aggiunge EtBr ad una concentrazione finale di 20  $\mu\text{g/ml}$ . Il gel, lasciato un poco a raffreddare viene colato su un vetrino da elettroforesi munito di un pettine che consente di formare i pozzetti per la corsa. Una volta polimerizzato il gel è posto nell'apparato ed immerso in un tampone di corsa, TBE a pH 8.

Frattanto si preparano i campioni che vengono diluiti in acqua e "loading buffer". La funzione del "loading buffer" è di appesantire il campione, facendolo andare sul fondo del pozzetto, e consentire al contempo di seguire la corsa elettroforetica.

Si caricano i campioni su gel e si applica una differenza di potenziale di 50/120 V per un tempo variabile dai 5 ai 60 minuti. Si visualizzano infine le bande degli acidi nucleici ponendo il gel sotto raggi UV; il bromuro di etidio che si è intercalato alle basi appare in queste condizioni luminescente.

Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori con peso molecolare noto. Nel caso si stia lavorando con RNA si prendono le vaschette da usare per colare i gel di agarosio e gli apparati elettroforetici e si rendono "RNase free" (RF) mediante pretrattamento con NaOH 0.1M per 20 minuti circa.

*Soluzioni:*

#### **TBE pH 8.0**

Tris base 0.089 M

Acido borico 0.089 M

EDTA 0.002 M

**Loading buffer 6x**

Glicerolo 5%

Blu di bromofenolo 0.05%

Xilene cianolo 0.05%

**Gel di agarosio**

Agarosio 1% (peso/volume)

Bromuro di etidio 20 µg/ml

TBE 1X a vol.

## 4. Risultati

### 4.1 Analisi funzionale del gene *hPDGF-B*

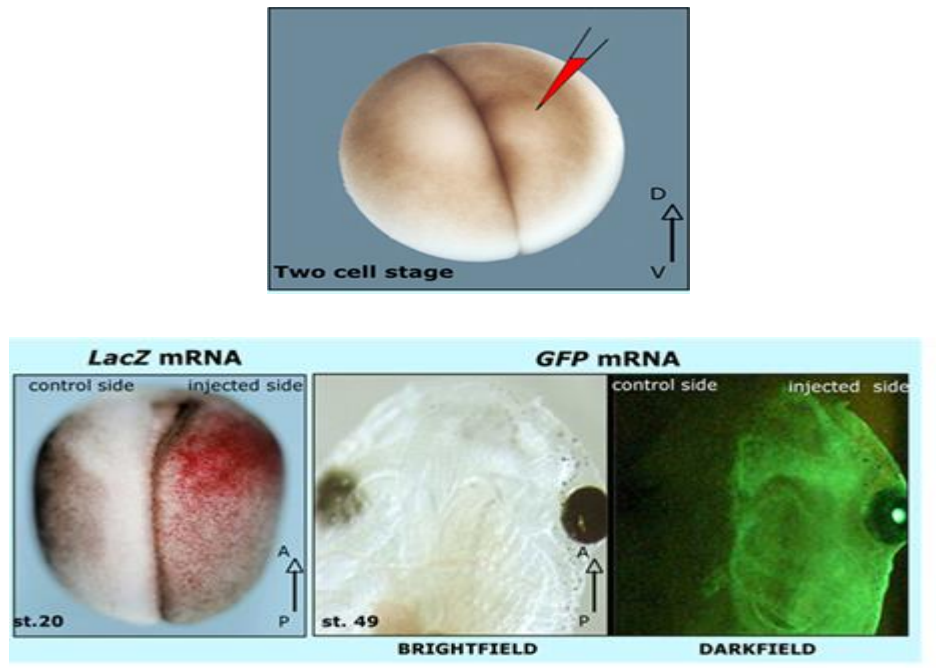
Il gene *hPDGF-B* è stato clonato nel vettore pCS2+ in precedenti attività svolte nel nostro laboratorio. Dal clone positivo è stato estratto il DNA plasmidico, questo è stato linearizzato e si è potuto trascrivere il messaggero da microiniettare come descritto precedentemente.

Una volta ottenuto l'mRNA stabile trascritto in vitro del gene PDGF-B umano (*hPDGF-B*), ho condotto analisi di guadagno di funzione genica per questo gene, eseguendo microiniezioni del trascritto in un singolo blastomero di embrioni di *Xenopus laevis* allo stadio di 2/4 cellule (Fig. 4.1). In tutti gli esperimenti di microiniezione che ho eseguito, insieme al trascritto per il PDGF-B umano ho anche coiniettato il messaggero di un gene "reporter" per visualizzarne la localizzazione. I geni "reporter" che ho utilizzato sono il gene che codifica per la proteina fluorescente "green fluorescent protein" (GFP), e il gene *lacZ*, che codifica per l'enzima batterico  $\beta$ -galattosidasi; quest'ultimo è in grado di metabolizzare un substrato cromogeno appropriato colorando in rosso o in azzurro – a seconda del substrato utilizzato – la porzione dell'embrione dove i trascritti si sono andati a localizzare. I messaggeri per questi geni – se microiniettati – non interferiscono infatti con il normale sviluppo dell'organismo in esame.

Le dosi, con cui i trascritti sono stati iniettati, ottimizzate in maniera tale da non produrre effetti tossici nell'embrione, sono state stabilite in studi precedenti condotti nel nostro laboratorio. In questo lavoro di tesi ho iniettato tra i 100 e 150 pg/embrione per il trascritto del *PDGF-B* umano e 300 pg/embrione per i trascritti di *lacZ* e *GFP*.

Una volta compiuta la microiniezione, ho fatto crescere gli embrioni a diversi stadi di sviluppo, prendendo in esame gli stadi di neurula (da stadio 13/14 a stadio 20) e

di tailbud (stadio 25). Dopo averli opportunamente fissati, ho potuto visualizzare la localizzazione dell'iniezione e la localizzazione dei trascritti, grazie alla reazione cromogenica della  $\beta$ -galattosidasi, oppure, prima di fissarli, grazie alla presenza della proteina verde fluorescente GFP (Fig. 4.1).



**Fig. 4.1:** Microiniezione in embrione di *Xenopus laevis* a stadio di 2 cellule; localizzazione dell'iniezione grazie alla reazione cromogenica della  $\beta$ -galattosidasi oppure grazie alla presenza della proteina verde fluorescente GFP

I fenotipi risultanti sono stati analizzati tramite ibridazione in situ "whole mount" per visualizzare con marcatori specifici (es: *Twist*, *Slug*, *FoxD3*) il comportamento di specifiche sottopopolazioni cellulari. Gli esperimenti di in situ sono stati condotti utilizzando delle sonde marcate con digossigenina (DIG) costituite da RNA antisenso complementare all'mRNA dei geni di cui si vuole analizzare l'espressione. La marcatura con digossigenina viene ottenuta inserendo nella miscela dei ribonucleotidi un UTP-ribonucleotide sostituito in posizione 11 con digossigenina, una molecola di origine vegetale che non è presente nelle cellule animali. Durante il processamento dell'embrione la sonda penetrerà all'interno dei tessuti e delle



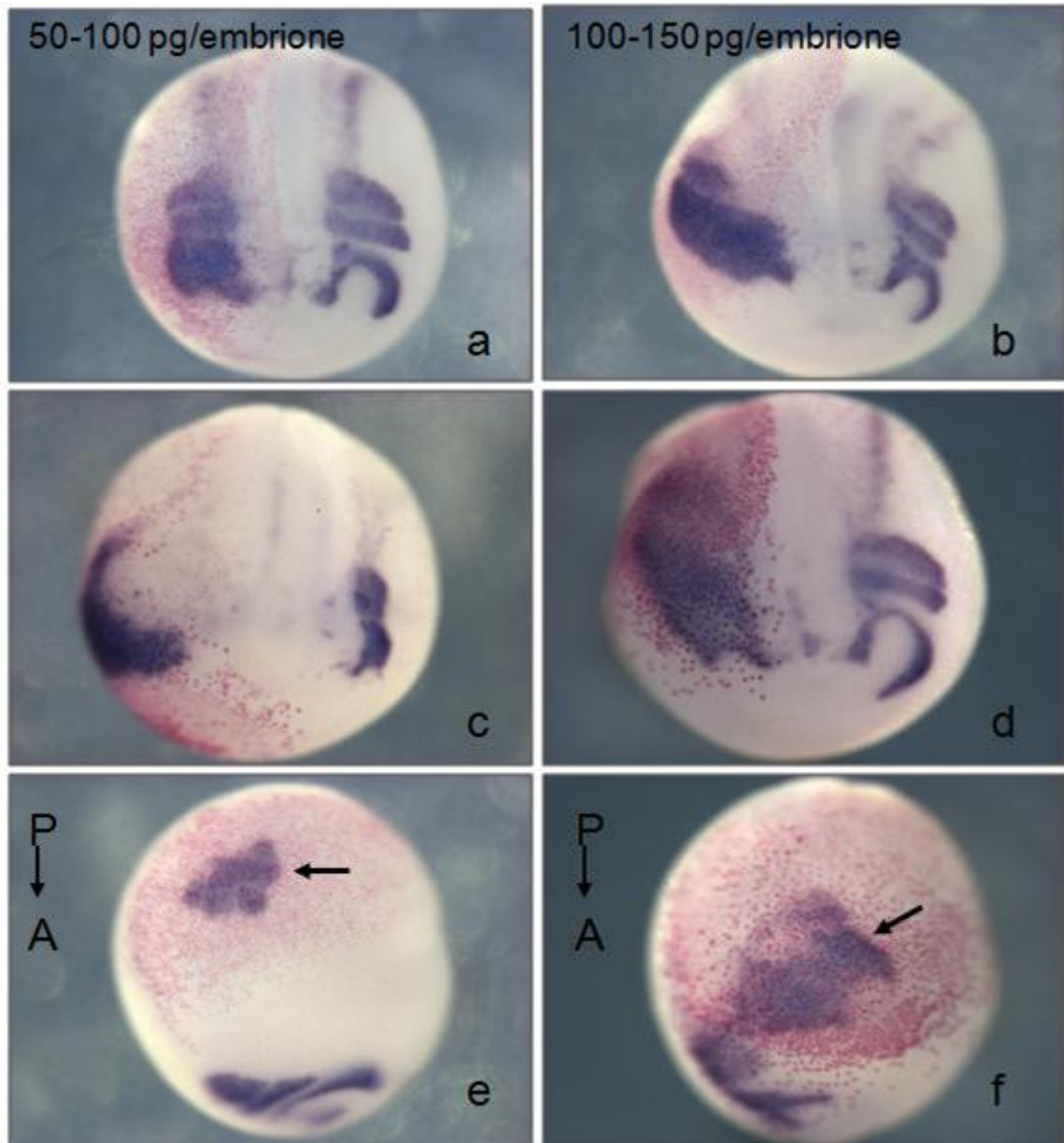
cellule, grazie a trattamenti che sfruttano anche l'utilizzo di alcuni detergenti permeabilizzanti ed andrà ad ibridarsi con gli mRNA endogeni complementari.

La rivelazione è stata fatta utilizzando un anticorpo in grado di legare specificamente la digossigenina (anti-DIG) a cui è coniugata la fosfatasi alcalina e in seguito utilizzando un substrato cromogenico di questo enzima come il "BM-purple" che forma un precipitato blu/viola intenso in corrispondenza delle zone dell'embrione dove è presente l'ibrido sonda-mRNA.

#### **4.2 Analisi delle alterazioni a livello delle creste neurali craniche in embrioni di *Xenopus laevis* microiniettati con il gene *hPDGF-B***

Per poter visualizzare il comportamento delle cellule della cresta neurale in vivo, ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* "whole mount", utilizzando diversi marcatori specifici per questa popolazione cellulare.

**Twist** – Uno dei marcatori usati è stato *Twist*, gene che codifica per un fattore di trascrizione che regola lo sviluppo delle cellule della cresta neurale craniche. . In principio ho analizzato embrioni a stadio 20 per poter visualizzare le fasi precoci del processo di migrazione delle NCC craniche che in *Xenopus* inizia a partire da stadio 19. (Fig. 4.2).

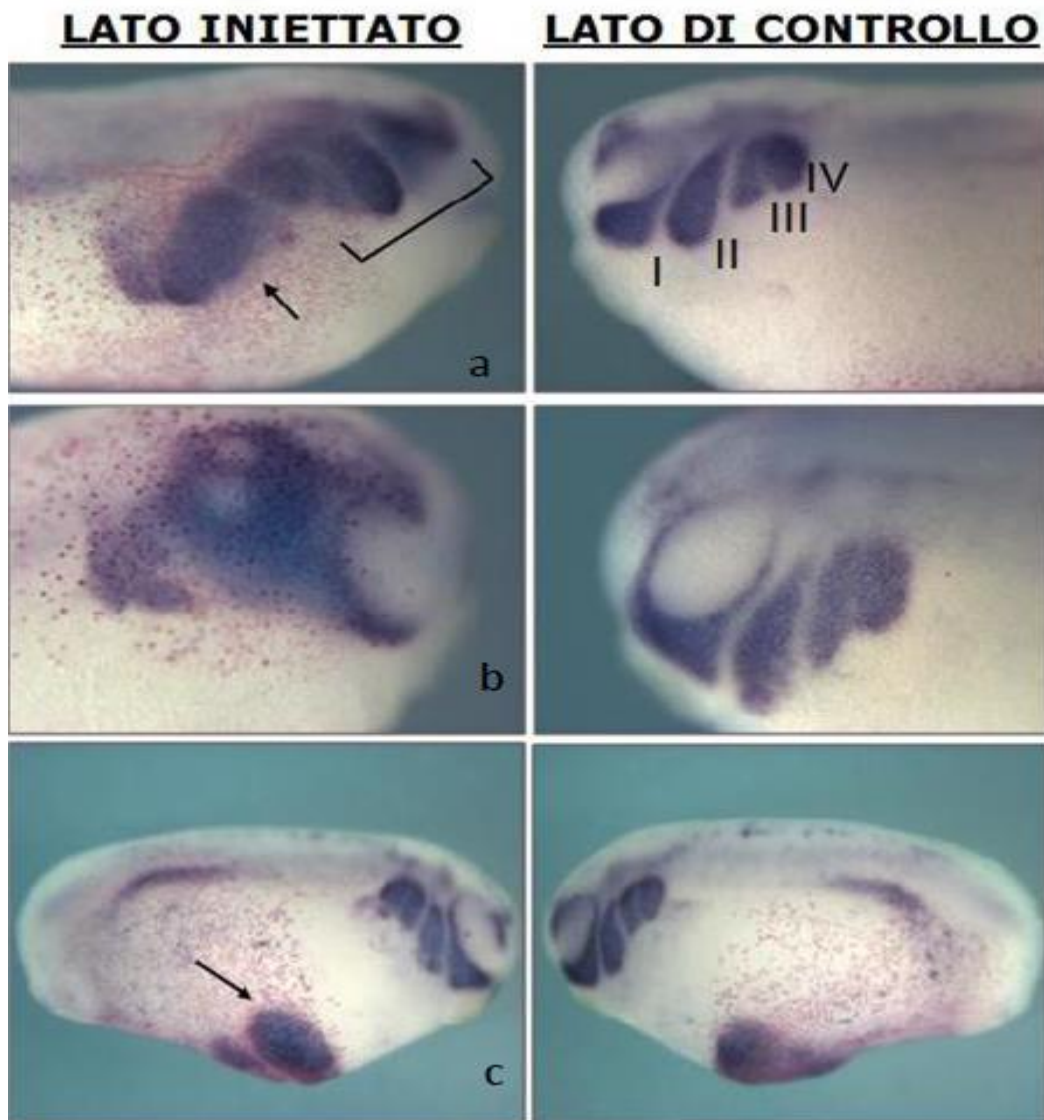


**Fig. 4.2: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *Twist*.** Esempi di embrioni in visione dorsale o laterale processati per ibridazione *in situ* a stadio 20, utilizzando come marcatore *Twist* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. Le frecce indicano la formazione di creste neurali ectopiche. In **a** iniezione di una dose bassa dell'*hPDGF-B* di 50-100 pg/embrione; in **b, c, d, e, f** iniezione di un'alta dose dell'*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione. **Fenotipo 94%, n=95 (si riferisce agli embrioni iniettati con alta dose di *hPDGF-B*).**

In questi embrioni si osservano diversi fenotipi che dipendono dalla dose del trascritto iniettata: negli embrioni meno affetti, iniettati con una dose bassa dell'*hPDGF-B* di **50-100 pg/embrione**, si osserva una parziale fusione degli "streams" migratori e il ritardo nella migrazione.

Microiniettando una dose più alta di circa **100-150 pg/embrione** si ha invece – oltre alla ricorrente fusione degli "streams" migratori – una forte espansione del dominio di espressione delle creste e talvolta si riscontra la presenza di creste neurali in posizione ectopica (indicate dalle frecce) nel sito dell'iniezione evidenziato dalla  $\beta$ -gal. La percentuale di fenotipi riportata (Fen 94%, n=95) si riferisce agli embrioni iniettati con un'alta dose di *hPDGF-B*.

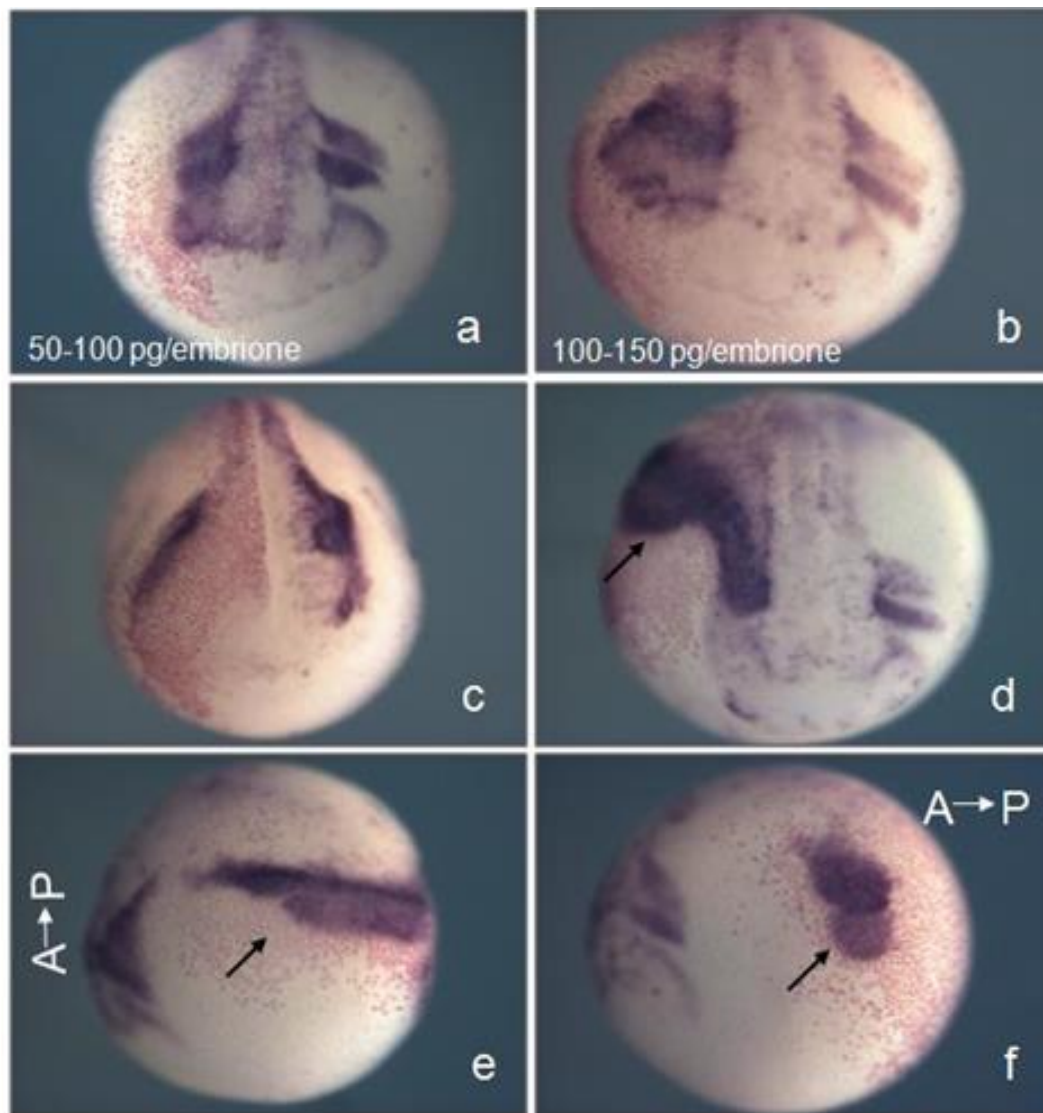
L'analisi con il marcatore *Twist* è stata effettuata anche a stadio 25 (Figura 4.3).



**Fig. 4.3: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *Twist*.** Visione laterale di embrioni processati per ibridazione *in situ* a stadio 25 utilizzando come marcatore *Twist* (in blu). In **a** e **b**, espansione del dominio di espressione delle creste e fusione degli streams migratori; in **c**, creste neurali ectopiche indicate dalla freccia. Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. I numeri I, II, III, IV indicano gli archi branchiali. **Fenotipo 96%, n=55.**

Nel lato iniettato, rispetto a quello di controllo, si osserva nel primo caso un'espansione del domino delle creste neurali (indicata dalla freccia) e la fusione degli "streams" migratori che non appaiono ben distinti come nel lato di controllo. Questo secondo fenotipo è visibile anche nel secondo embrione. Infine nel terzo caso si può ben notare la presenza di creste neurali ectopiche in corrispondenza della colorazione rossa della  $\beta$ -gal. La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 96% (con n=55).

**FoxD3** – Un altro marcatore che ho utilizzato negli esperimenti di ibridazione *in situ* "whole mount", in quanto marca l'intera popolazione delle cellule della cresta neurale è stato *FoxD3* (Figura 4.4). Ho analizzato inizialmente embrioni a stadio 20.

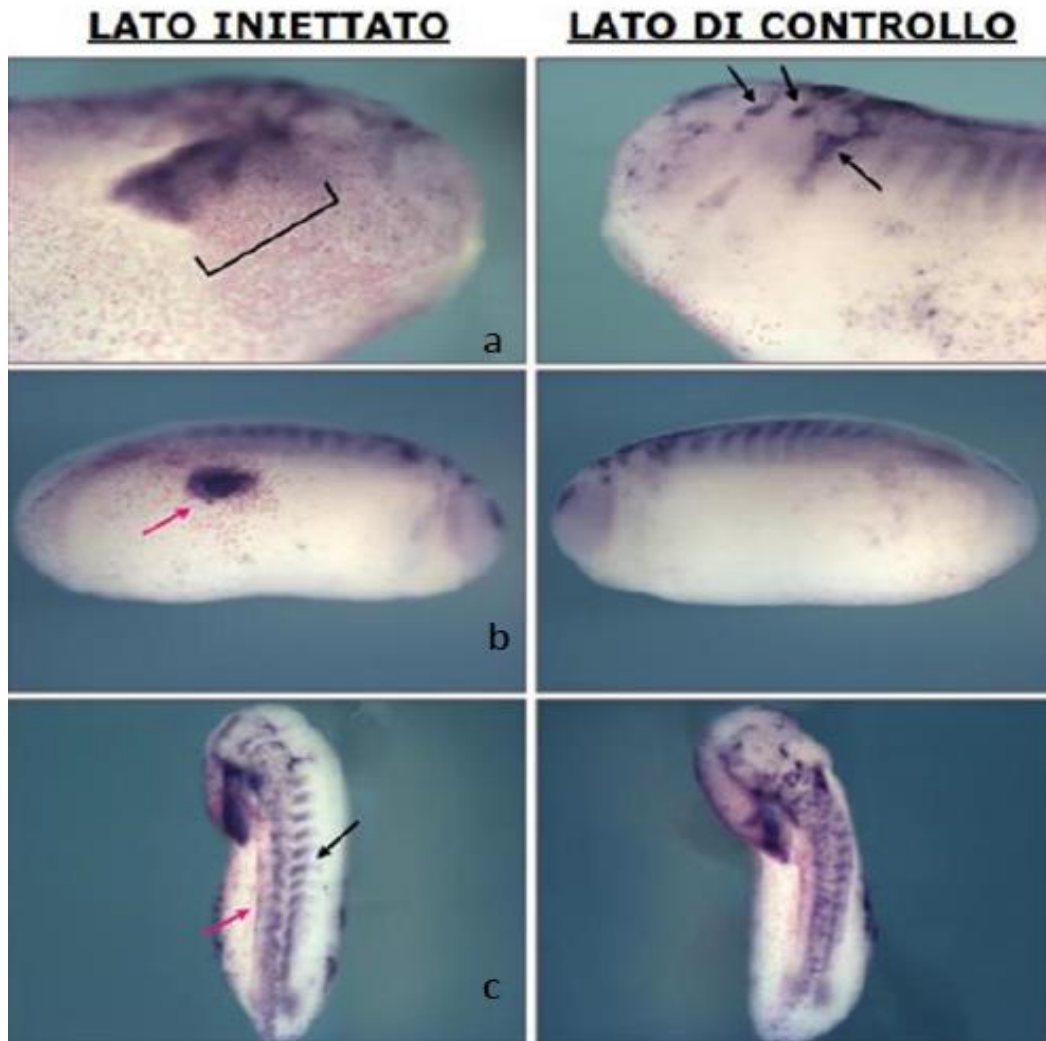


**Fig. 4.4: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *FoxD3*.** Esempi di embrioni in visione dorsale o laterale processati per ibridazione *in situ* a stadio 20 (neurula tardiva), utilizzando come marcatore *FoxD3* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. Le frecce indicano un'espansione del dominio delle creste e nelle ultime due figure la formazione di creste ectopiche. In **a** iniezione di una dose bassa dell'*hPDGF-B* di 50-100 pg/embrione; in **b, c, d, e, f** iniezione di un'alta dose dell'*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione. **Fenotipo 83%, n=64 (si riferisce agli embrioni iniettati con alta dose di *hPDGF-B*).**

Il gene *FoxD3* appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione “forkhead” e promuove lo sviluppo delle cellule della cresta neurale dai progenitori del tubo neurale; è inoltre necessario per la loro crescita e il loro mantenimento.

Quello che si può osservare in questi embrioni è un fenotipo vario, dipendente dalla dose iniettata del trascritto e caratterizzato da: fusione degli “streams” migratori (dose bassa di 50-100 pg/embrione), espansione del dominio delle creste neurali e presenza di marcatura in posizione ectopica (dose più alta di circa 100-150 pg/embrione). La percentuale di fenotipi riportata (Fen 83%, n=64) si riferisce agli embrioni iniettati con un’alta dose di *hPDGF-B*.

L'analisi con il marcatore *FoxD3* è stata effettuata anche a stadio 25 (Figura 4.5).



**Fig. 4.5: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *FoxD3*.** Visione laterale e dorsale di embrioni processati per ibridazione *in situ* a stadio 25 utilizzando come marcatore *FoxD3* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. In **a**, evidenziata l'espansione del dominio di espressione delle creste, che non si riscontra nel lato di controllo, dove le frecce indicano la normale conformazione degli streams migratori; in **b**, presenza di uno spot ectopico, indicata dalla freccia rossa; in **c**, alterazione dello sviluppo dei somiti nel lato iniettato, indicato dalla freccia rossa.

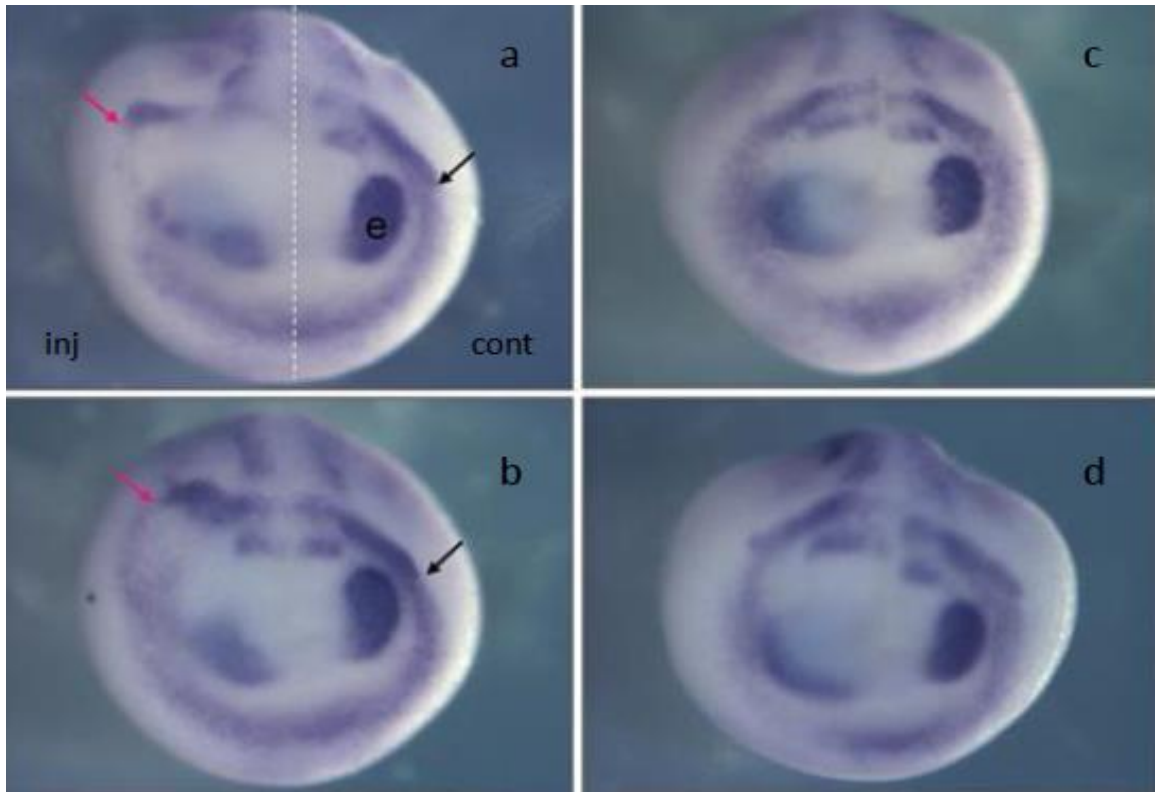
**Fenotipo 79%, n=71.**



In embrioni a stadio 25 (Figura 4.5), in cui *FoxD3* marca la componente dei gangli dei nervi cranici derivata dalla cresta neurale, la marcatura nel lato iniettato rivela nuovamente fusione di diverse sottopopolazioni di NCC ed un dominio di espressione aumentato e non correttamente localizzato. Si può analizzare un fenotipo nuovo nel lato iniettato di embrioni visti in posizione dorsale: lo sviluppo dei somiti non è completo, come nel lato di controllo, ma è appena accennato ed è visibile anche un'alterazione della distribuzione delle cellule delle creste neurali del tronco. La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 79% (con n=71).

**EprhinB2** – Ho voluto studiare il comportamento delle NCC anche attraverso un marcatore specifico per una loro sottopopolazione e per alcuni rombomeri: *EprhinB2*, è infatti espresso nell'occhio, nei rombomeri 2 e 4 e nelle NCC che migrano nell'arco ioideo.

Le efrine sono le principali proteine implicate nel limitare la migrazione delle cellule della cresta neurale. Sia i ligandi che i recettori delle efrine sono proteine ancorate alla membrana plasmatica. Il legame del ligando al recettore determina la stabilità dei compartimenti cellulari, per cui le efrine sono espresse nei rombomeri e nelle creste neurali per mantenere distinta identità tra popolazioni di cellule adiacenti ma che devono avere destini differenziativi distinti. Da ciò si comprende come l'*EfrinB2* risulti utile per studiare eventuali modificazioni del contatto cellula-cellula. Un fenotipo molto evidente è riscontrabile negli embrioni marcati con l'*EprhinB2* che sono stati analizzati a stadio 20 (Figura 4.6) e a stadio 25 (Figura 4.7).

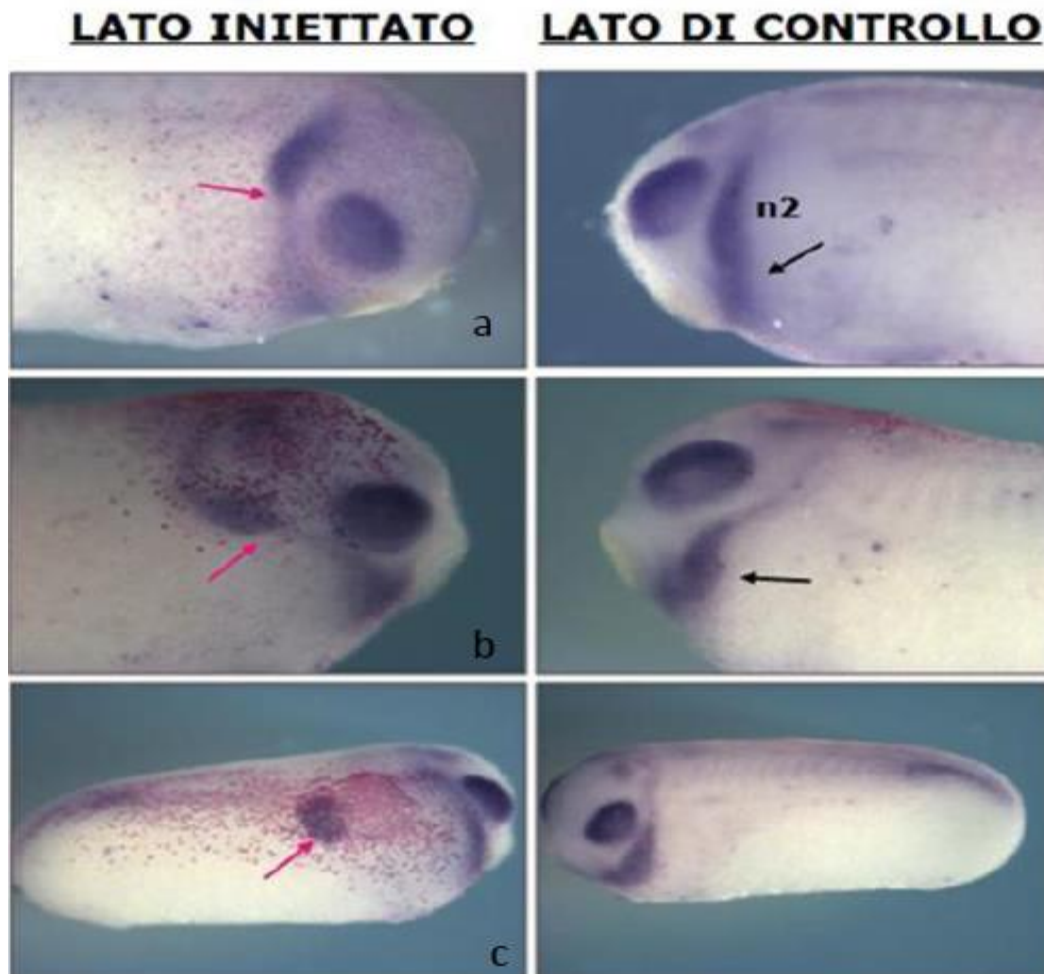


**Fig. 4.6: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *EphrinB2*.** Esempi di embrioni in visione frontale processati per ibridazione *in situ* a stadio 20, utilizzando come marcatore *EphrinB2* (in blu). In **a** e **b**, alterazione della migrazione delle cellule della cresta neurale che emergono dal rombomero 4, indicate dalla freccia rossa; con **e** è indicata la posizione dell'occhio. Gli embrioni sono stati selezionati sulla base dell'espressione della GFP al microscopio a fluorescenza. Il lato iniettato è quello a sinistra. **Fenotipo 81%, n=62.**

Questa volta la selezione degli embrioni microiniettati è stata fatta visualizzando la GFP al microscopio a fluorescenza. Gli embrioni presenti in figura sono stati iniettati nel lato sinistro, in cui si osserva un'alterazione della migrazione delle cellule della cresta neurale che emergono dal rombomero 4 e che dovrebbero migrare nell'arco ioideo. La specificazione dei rombomeri 2 e 4 del rombencefalo non sembra essere alterata. Inoltre, l'occhio non è definito e la sua posizione è spostata rispetto a quella nel lato di controllo. La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 81% (con n=62).

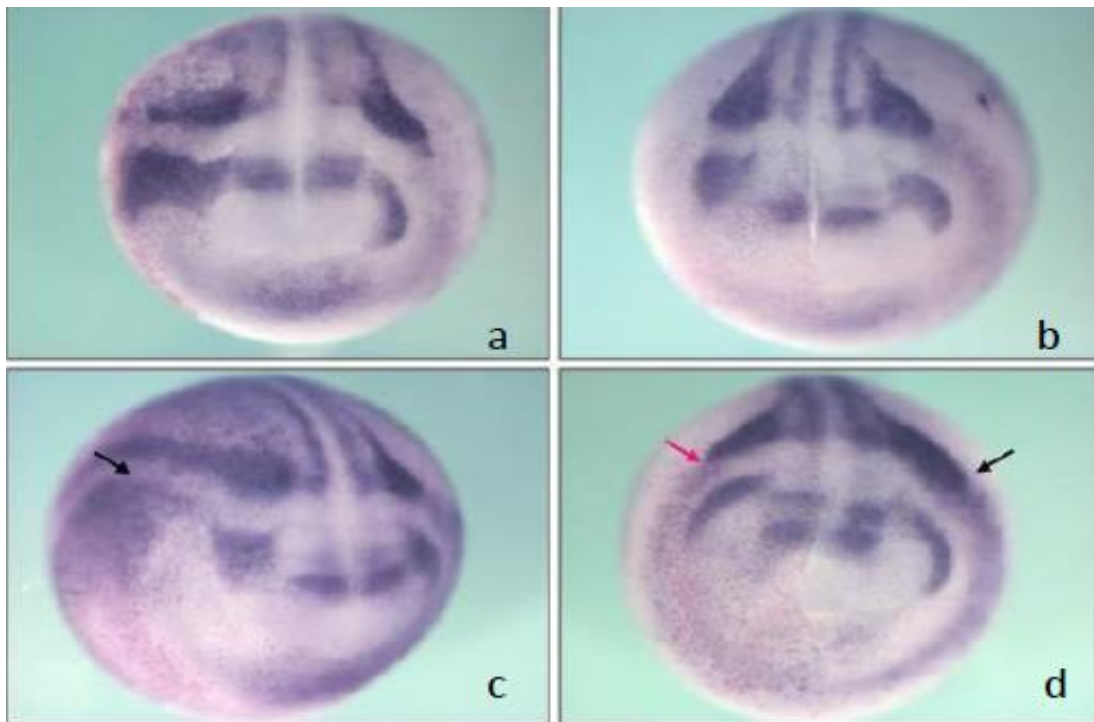
Anche a stadi più avanzati, a stadio 25, nel lato iniettato è ancora visibile un fenotipo a carico delle creste neurali che presentano un ritardo nella migrazione (indicato dalla freccia). Inoltre in alcuni embrioni si può osservare espressione ectopica dell'*EfrinaB2* nelle regioni ventro-laterali dell'embrione.

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 69% (con n=63).

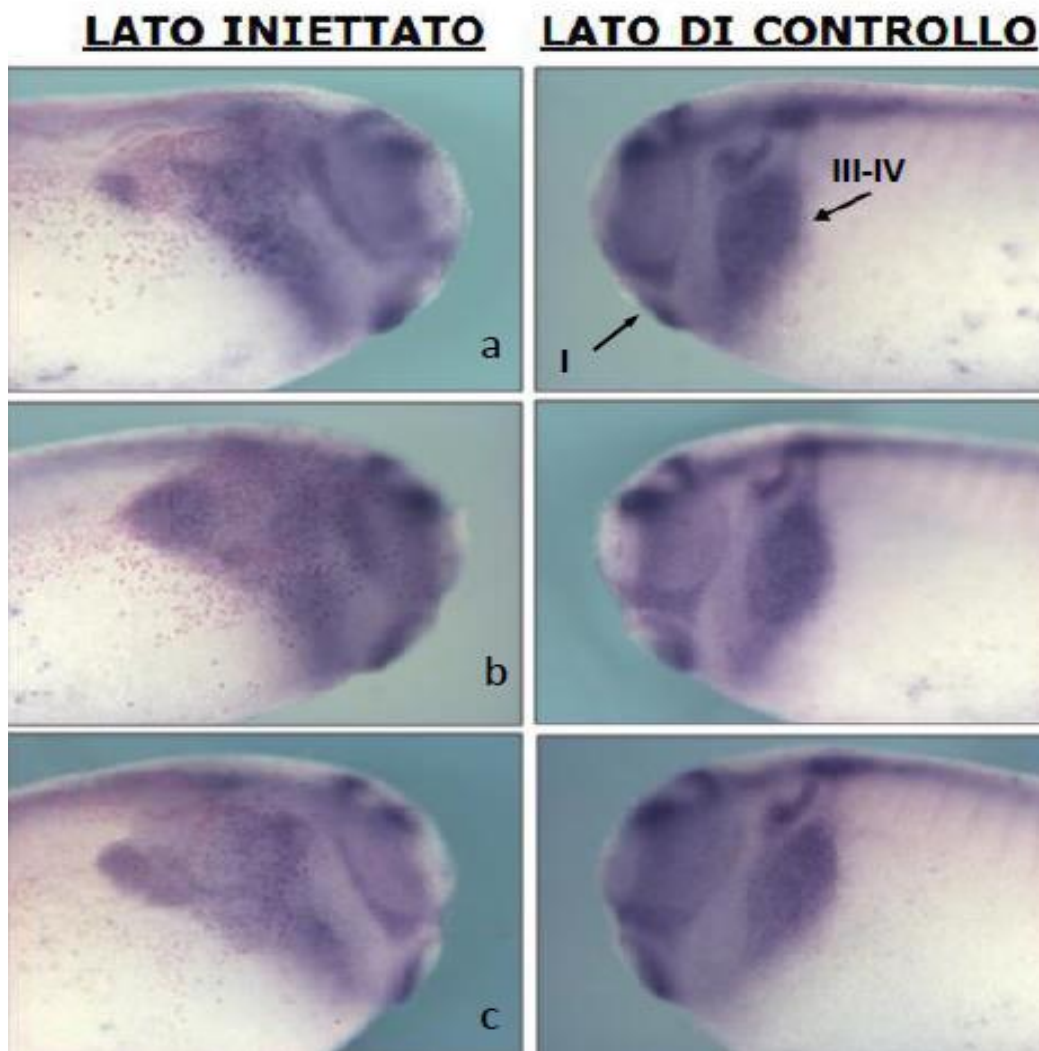


**Fig. 4.7:** La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *EphrinB2*. Visione laterale di embrioni processati per ibridazione *in situ* a stadio 25 utilizzando come marcatore *EphrinB2* (in blu). In **a** e **b**, ritardo della migrazione delle creste, indicato dalle frecce; in **c**, espressione ectopica. Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa; n2 sta per secondo arco branchiale ovvero quello ioideo. **Fenotipo 69%, n=63.**

**EphB1** – Con lo scopo di esaminare eventuali modificazioni delle interazioni cellula-cellula, oltre a studiare l'espressione del ligando *EfrinaB2*, ho analizzato quella del recettore per le efrine *EphB1*, anch'esso coinvolto nel regolare e mantenere la segmentazione delle NCC in "streams" definiti. *EphB1* è espresso nelle cellule della cresta neurale che migrano nel primo e nel terzo-quarto arco branchiale e che emergono rispettivamente dal mesencefalo e i primi due rombomeri e dal quinto e sesto rombomero. Nel lato iniettato di embrioni fissati a stadio 20 (Figura 4.8) ricorre nuovamente il ritardo nella migrazione delle NCC e l'espansione del loro dominio di espressione, fenotipo presente anche nel lato iniettato degli embrioni fissati a stadio 25 (Figura 4.9).



**Fig. 4.8: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *EphB1*.** Visione frontale di embrioni processati per ibridazione *in situ* a stadio 20 utilizzando come marcatore *EphB1* (in blu). In c e d, ritardo della migrazione delle NCC, indicato dalle frecce. Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. **Fenotipo 79%, n=60.**



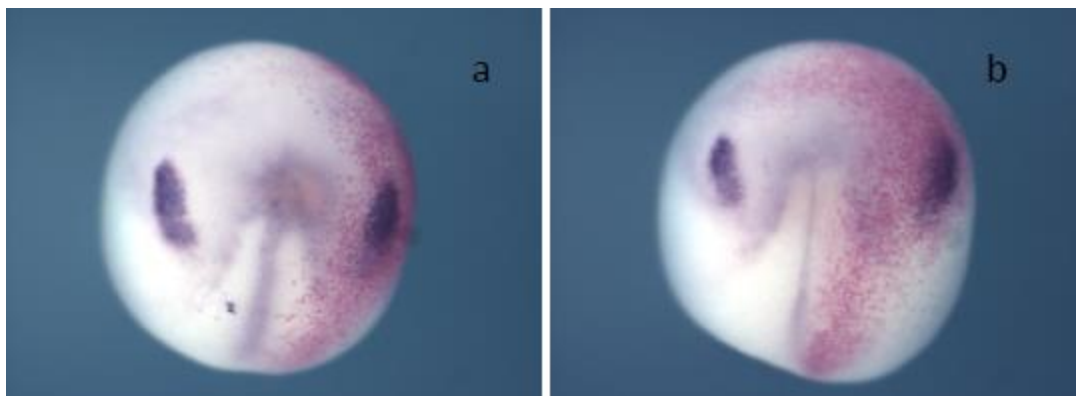
**Fig. 4.9:** La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *EphB1*. Visione laterale di embrioni processati per ibridazione *in situ* a stadio 25 utilizzando come marcatore *EphB1* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. I numeri I, III-IV indicano gli archi branchiali. **Fenotipo 67%, n=59.**

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 79% (con n=60) a st 20, e del 67% (con n=59) a st 25.

Dopo aver confermato, con l'analisi mostrata, che la sovraespressione di *hPDGF-B* è chiaramente in grado di alterare il comportamento delle NCC craniali mi sono domandato quando durante lo sviluppo sia possibile collocare l'insorgenza del fenotipo osservato.

A questo scopo ho ripetuto gli esperimenti di microiniezione concentrando però la mia analisi su embrioni a stadi di neurula precoce. In particolare ho osservato il comportamento delle NCC in embrioni a stadio 13-14 e a stadio 15-16.

**Twist** – Ho analizzato quindi il comportamento delle NCC utilizzando come marcatore *Twist* (Fig 4.10 e Fig. 4.11):



**Fig. 4.10: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *Twist*.** Esempi di embrioni in visione dorsale processati per ibridazione *in situ* a stadio 13-14, utilizzando come marcatore *Twist* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. In **a** e in **b** iniezione di un'alta dose dell'*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione. **Fenotipo 53%, n=53.**

In questo caso – come si può notare dalle figure (Fig. 4.10) – non si riscontrano alterazioni evidenti che possano suggerire un ruolo del PDGF-B sovraespresso nelle fasi precoci di induzione delle creste neurali. Talvolta è possibile osservare una parziale e leggera espansione del dominio di espressione delle creste; inoltre la percentuale di embrioni che mostrano un fenotipo cala vistosamente e non si sono

mai riscontrati a questi stadi embrionali con presenza di spots ectopici marcati con *Twist*. Questi dati indicano che la sovraespressione del PDGF-B non è in grado di indurre i fenotipi riscontrati in precedenza, ad uno stadio così precoce o ad ogni modo, non in maniera apprezzabile. Per quanto concerne invece embrioni a stadio 15-16 la situazione è ben diversa e gli effetti della sovraespressione risultano essere più evidenti (Fig. 4.11): oltre alla ricorrente fusione degli “streams” migratori si nota una forte espansione del dominio di espressione delle creste; inoltre sembra che tali NCC vadano a “migrare” più posteriormente di quanto non accada per il lato di controllo.

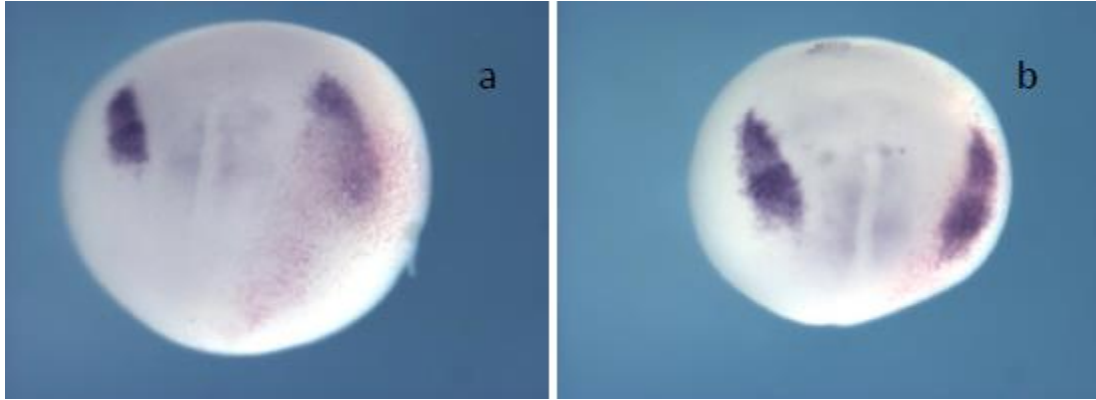


**Fig. 4.11: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *Twist*.** Esempi di embrioni visti dall’alto processati per ibridazione *in situ* a stadio 15-16, utilizzando come marcatore *Twist* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. In **a, b e c** iniezione di un’alta dose dell’*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione. **Fenotipo 80%, n=61.**

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 53% (con n=53) a st 13-14, e del 80% (con n=61) a st 15-16.



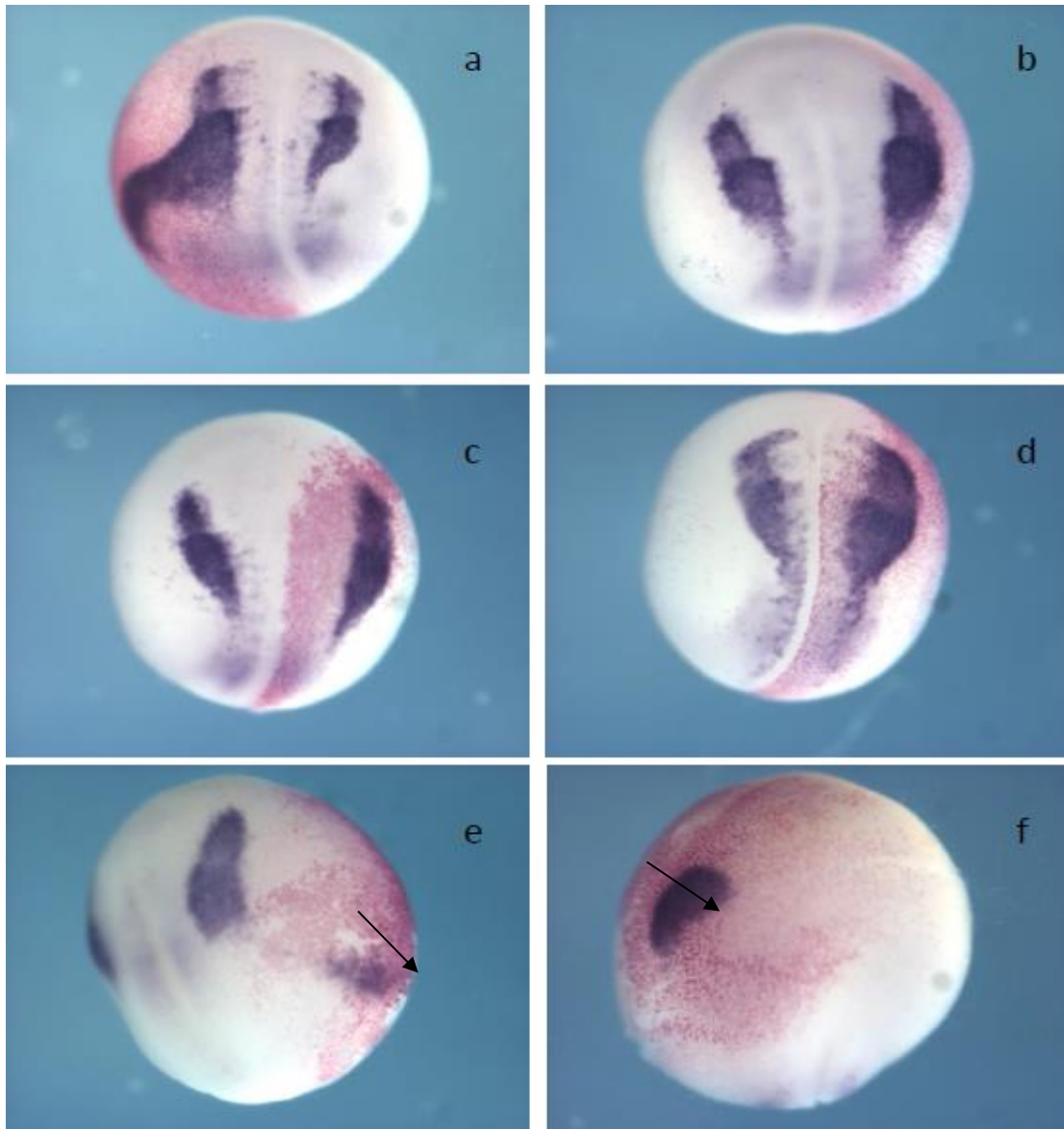
**FoxD3** – Ho valutato l'effetto del PDGF-B sul comportamento delle NCC in stadi precoci utilizzando anche il marcatore *FoxD3*; anche in questo caso ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* “whole mount” a stadio 13-14 e a stadio 15-16 (Fig.4.12 e Fig. 4.13.).



**Fig. 4.12: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *FoxD3*.** Esempi di embrioni in visione dorsale processati per ibridazione *in situ* a stadio 13-14, utilizzando come marcatore *FoxD3* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. In **a** e **b**, iniezione di un'alta dose dell'*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione **Fenotipo 50%, n=75**.

In questo caso gli effetti fenotipici riscontrati sembrano leggermente più evidenti di quanto non evidenziato con *Twist*: in particolare, si riscontra una più evidente espansione del normale dominio di espressione delle NCC (Fig. 4.12). Anche in questo circostanza comunque, la percentuale di embrioni che mostrano un fenotipo è minore rispetto a quella osservata a stadi più tardivi. A stadio 15-16 infatti – anche in questo caso – gli effetti sono senz'altro più evidenti: oltre ad un evidente fusione dei canonici “streams” migratori ed all'aumento del dominio di espressione delle creste, si può notare una significativa alterazione del comportamento delle creste neurali e in alcuni casi l'accensione di marcatori per le creste neurali in posizioni ectopiche (Fig. 4.13).

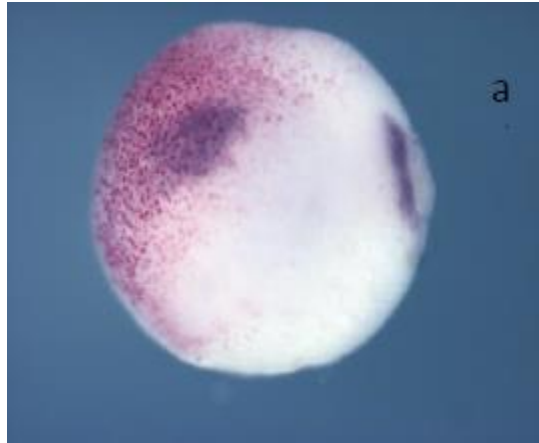




**Fig. 4.13: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *FoxD3*.** Esempi di embrioni in visione dorsale o laterale processati per ibridazione *in situ* a stadio 15-16, utilizzando come marcatore *FoxD3* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. Le frecce indicano la formazione di creste ectopiche. In **a,b, c, d, e, f** iniezione di un'alta dose dell'*hPDGF-B* di 100-150 pg/embrione. **Fenotipo 80%, n=94.**

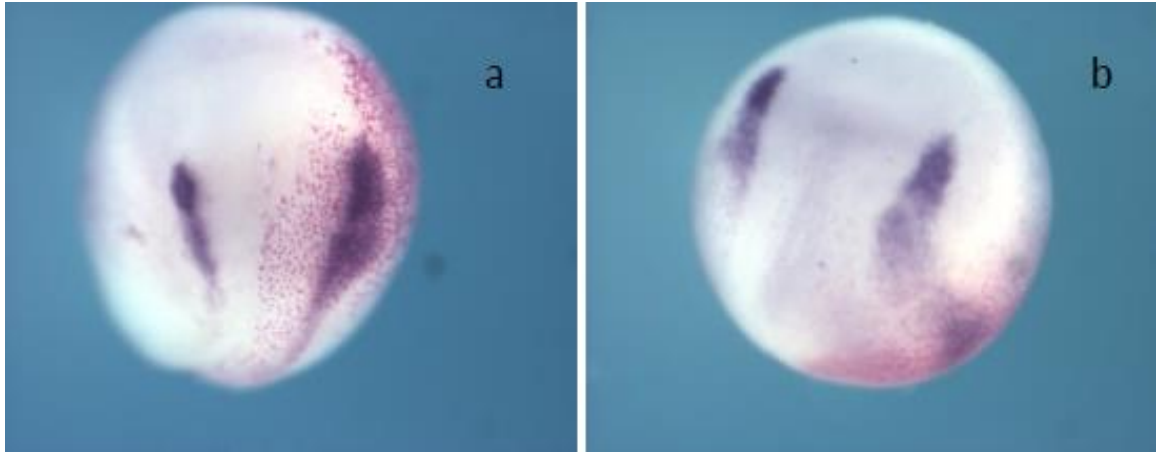
La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 50% (con n=75) a st 13-14, e del 80% (con n=94) a st 15-16.

**Slug** – Questo effetto della sovraespressione del *hPDGF-B* sulla migrazione delle NCC può essere messo in evidenza utilizzando anche un altro marcatore ovvero *SLUG*, che è un fattore di trascrizione coinvolto nella trasformazione epitelio-mesenchimatica delle cellule della cresta neurale. Anche in questo caso l'analisi è stata condotta in embrioni a stadio 13-14 (Fig. 4.14) e in embrioni a stadio 15-16 (Fig. 4.15).



**Fig. 4.14: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *SLUG*.** Esempi di embrioni visti dall'alto processati per ibridazione *in situ* a stadio 13-14, utilizzando come marcatore *SLUG* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. **Fenotipo 48%, n=50.**

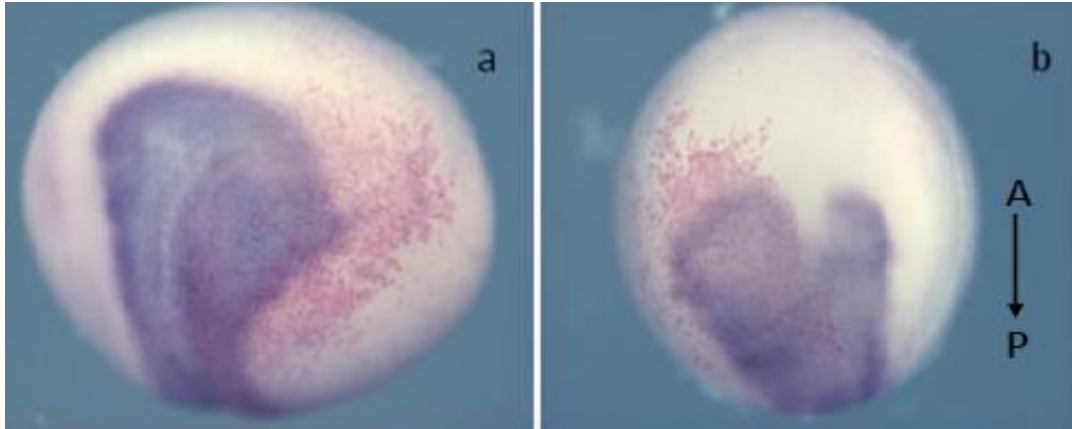
L'effetto fenotipico più rilevante che si riscontra è l'espansione del normale dominio di espressione delle NCC (Fig. 4.14). Anche in questa circostanza comunque, la percentuale di embrioni che mostrano un fenotipo è minore rispetto a quella osservata a stadi più tardivi. A stadio 15-16 gli effetti sono senz'altro più evidenti (Fig. 4.15): oltre ad un evidente fusione dei canonici "streams" migratori ed all'aumento del dominio di espressione delle creste, si può notare una significativa alterazione del comportamento delle creste neurali e in alcuni casi l'accensione di marcatori per le creste neurali in posizioni ectopiche.



**Fig. 4.15: La sovraespressione di *hPDGF-B* altera il comportamento delle cellule della cresta neurale che esprimono *SLUG*.** Esempi di embrioni visti dall'alto processati per ibridazione *in situ* a stadio 15-16, utilizzando come marcatore *SLUG* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. **Fenotipo 73%, n=75.**

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 48% (con n=50) a st 13-14, e del 73% (con n=75) a st 15-16.

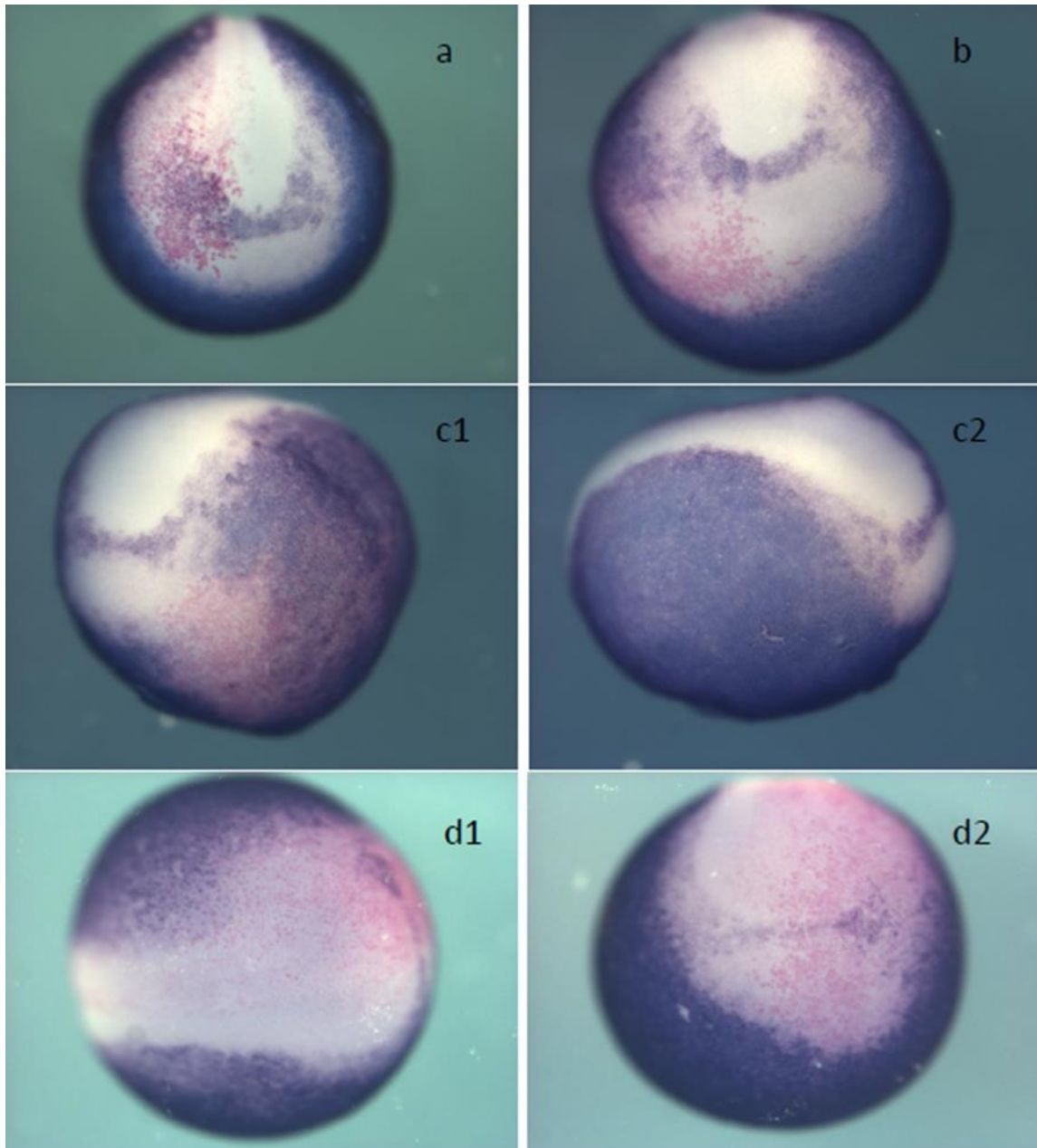
**Sox2** – Per valutare se l' aumento del territorio delle creste, abbia effetti sul normale sviluppo dell'embrione, ho infine effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* “whole mount” utilizzando anche sonde contro l'attivatore trascrizionale Sox2, in embrioni di *Xenopus* a stadio 15-16. Tale fattore funziona come un interruttore nello sviluppo neuronale, partecipando al differenziamento delle cellule embrionali neuroectodermiche verso un destino a tessuto neurale. La sua espressione segna inoltre la regione in cui verrà a formarsi la futura piastra neurale tra cui anche le cellule della cresta neurale. Come si può notare dalle figure (Fig. 4.17), l'effetto del PDGF-B – anche in questo caso – sembra mediare un aumento del dominio di espressione di Sox2 rispetto al lato di controllo.



**Fig. 4.16: La sovraespressione di *hPDGF-B* provoca un aumento del dominio di espressione di *Sox2*.** Esempi di embrioni in visione dorsale processati per ibridazione *in situ* a stadio 15-16, utilizzando come marcatore *Sox2* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. **Fenotipo 75%, n=43.**

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 75% (con n=43) a st 15-16.

**K81** – Per verificare se all’aumento del dominio di espressione di *Sox2* potesse corrispondere una riduzione del territorio destinato a dare ectoderma ho utilizzato come marcatore XK81, per visualizzare l’ectoderma destinato a dare tessuti epidermici (Jonas et al. 1985). L’analisi – anche in questa circostanza – è stata condotta a stadio 15-16 (Fig. 4.18). Come si può notare dalle figure, tale marcatore va a segnare quelle regioni dove normalmente *Sox2* non è espresso: nel lato iniettato – rispetto al lato di controllo – si può evidenziare una diminuzione del dominio di espressione delle cellule che esprimono questo marcatore, a favore dell’espressione di *Sox2* (Fig. 4.17).



**Fig. 4.17: La sovraespressione di *hPDGF-B* inibisce l'espressione di *K81*.** Esempi di embrioni in visione dorsale e laterale processati per ibridazione *in situ* a stadio 15-16, utilizzando come marcatore *K81* (in blu). Il lato iniettato è riconoscibile grazie alla colorazione rossa. **Fenotipo 77%, n=45.**

La percentuale dei fenotipi riscontrata è del 77% (con n=45) a st 15-16.

### 4.3 Analisi tramite marcatore di creste neurali in animal caps prodotti da embrioni iniettati con *hPDGF-B*

Come esplicito in precedenza, in maniera inaspettata ho riscontrato negli iniettati un'alta frequenza di embrioni che presentavano spots ectopici di cellule esprimenti marcatori di creste neurali. Per tentare di comprendere questo fenomeno e valutare se l'azione del *PDGF-B* sia in grado – indipendentemente dall'influenza di altri fattori – di indurre formazione di creste neurali, ho condotto esperimenti su “animal caps”, prelevati da embrioni precedentemente microiniettati con l'RNA messaggero di *hPDGF-B* su entrambi i lati (2/2). Gli animal caps così prodotti sono stati fatti crescere fino allo stadio 20 e sono stati selezionati per la *GFP* al microscopio a fluorescenza (Fig. 4.19); tale selezione mi ha permesso di processare solo gli espianti correttamente iniettati. Gli animal caps sono stati preparati anche a partire da embrioni wt – non iniettati – e usati come controllo.



**Fig. 4.18 Visione dall'alto di animal caps (stadio 20):** in **a** embrioni di *Xenopus laevis* a stadio 20 in **b**, animal caps in campo chiaro; in **c**, animal caps alla fluorescenza

Per ottenere una quantità sufficiente di RNA totale sono stati selezionati tra i 50 e i 55 caps iniettati o non iniettati per esperimento. A questo punto ho effettuato l'estrazione dell'RNA (Fig. 4.20). Successivamente per evitare ogni eventuale contaminazione da DNA genomico, ho sottoposto i campioni ad un trattamento con DNAsi prima di procedere con la retrotrascrizione.



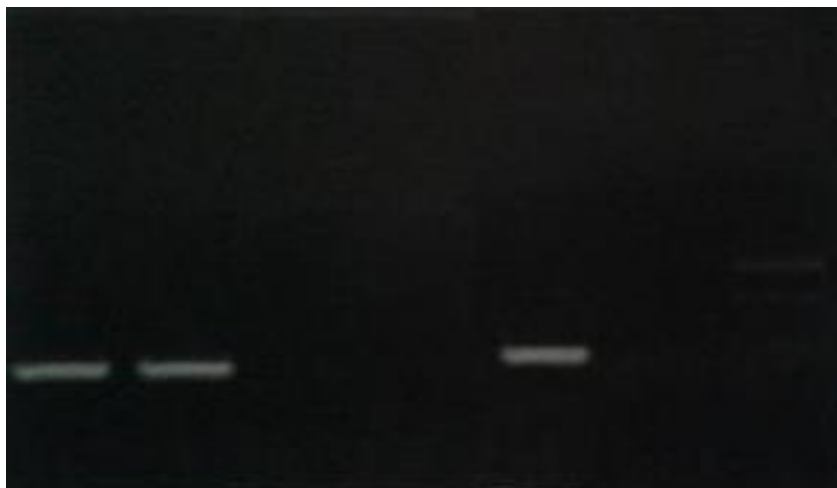
**Fig. 4.19: Corsa elettroforetica su gel d'agarosio dell'RNA proveniente da caps WT e caps iniettati;** in ordine, rispettivamente: RNA caps WT, RNA caps iniettati, t-RNA 400 ng/ $\mu$ l.

Una volta ottenuto l'RNA, ho eseguito quindi una RT-PCR, tecnica che mi consente di amplificare il cDNA partendo dall'RNA totale estratto. Il controllo, –RT, è stato fatto omettendo l'enzima trascrittasi inversa dal campione.

Prima di amplificare il cDNA così ottenuto con “primers” specifici per marcatori di creste neurali, ho eseguito una PCR “di controllo” sul medesimo, utilizzando “primers” in grado di amplificare un gene “housekeeping) (*ODC*, ornitina decarbossilasi) verificando la presenza di amplificato sia per quanto concerne il cDNA prodotto a partire dai caps WT sia per quanto concerne il cDNA prodotto a partire dai caps iniettati; lo stesso ho fatto per le –RT: la –RT mi serve infatti per determinare se l'amplificato che osservo nel campione deriva dal cDNA di sintesi o se deriva da DNA genomico residuo o dal frutto di altre contaminazioni dell'amplicone.

Come si può osservare nella figura (Fig. 4.21), il gene housekeeping (*ODC*) è stato amplificato sia a partire dal cDNA dei caps WT, sia a partire dal cDNA dei caps iniettati; le –RT inoltre sono risultate pulite.





**Fig. 4.20: PCR di controllo;** nell'ordine, rispettivamente: cDNA caps wt, cDNA caps iniettati, -RT cDNA caps wt, -RT cDNA caps iniettati, controllo positivo, bianco e ladder

Una volta appurata la bontà dei campioni, ho infine eseguito una PCR sui cDNA così ottenuti (35 cicli), utilizzando dei “primers” specifici per un marcatore di creste neurali (*Twist*), al fine di verificare se l'azione del PDGF-B fosse in grado di “accendere” – indipendentemente da altri fattori – tale marcatore in un tessuto indifferenziato come quello degli animal caps; per confermare tale ipotesi in maniera più rigorosa si sono utilizzati anche “primers” specifici per un marcatore mesodermico (*Brachiury*): tale misura è stata presa in primo luogo, per valutare la buona riuscita della produzione degli animal caps – che devono essere privi di tessuto mesodermico – per scongiurare una eventuale induzione secondaria di tessuto neurale, ad opera del mesoderma stesso.

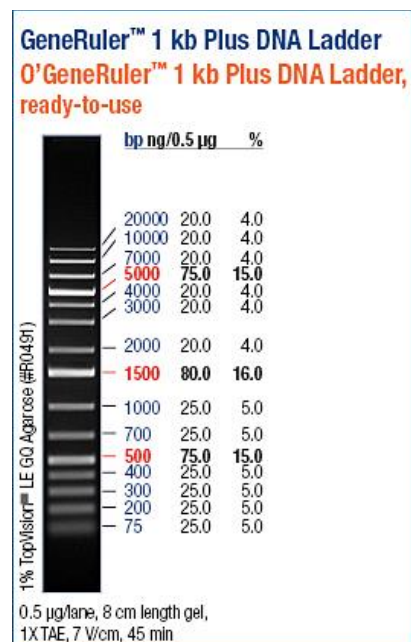
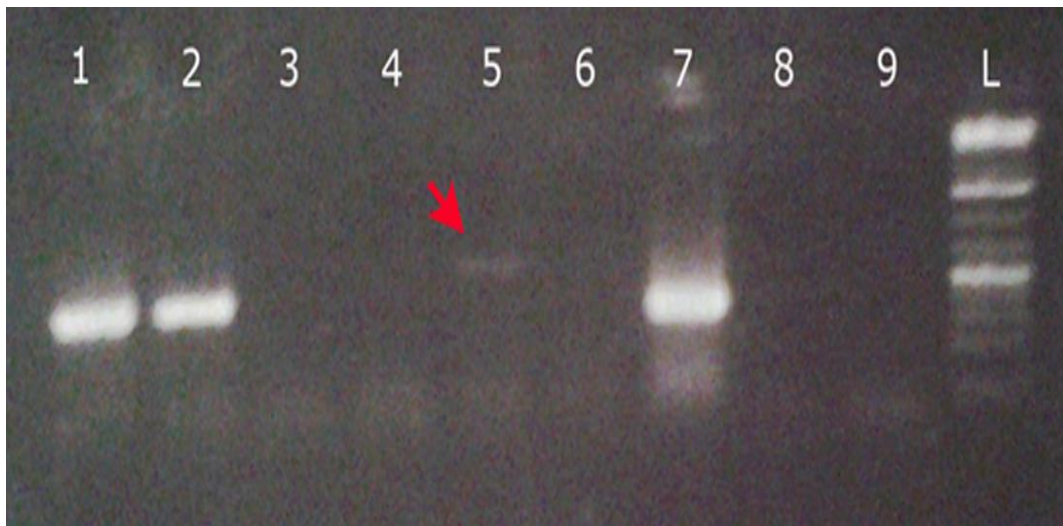
Come si può evincere dalla figura (Fig. 4.22), sia per quanto concerne caps wt e sia per quanto concerne caps iniettati non ho amplificato utilizzando “primers” per il marcatore mesodermico *Bra*; nell'analisi sono stati ritestati anche i “primers” per il gene housekeeping (*Odc*), che coerentemente con quanto visto in precedenza, mostrano amplificato sia nei caps wt e sia nei caps iniettati.

Infine, per quanto concerne il marcatore di creste (*Twist*), si può notare la sola presenza di amplificato nel caso dei caps iniettati con l'hPDGF-B (come indicato



dalla freccia), mentre – coerentemente con le attese – tale amplificazione non sussiste per i caps wt: questo porterebbe alla conclusione che l'azione dell'hPDGF-B sia in grado di indurre creste neurali in tessuto indifferenziato.

Inoltre, a confermare che l'amplificazione è avvenuta effettivamente su *Twist* è la grandezza dell'amplificato: i "primers" sono stati disegnati in modo tale da poter discriminare i vari amplificati in base alle loro dimensioni. In particolare, l'amplificato di *Twist* ha una lunghezza di 681 bp: confrontando la corsa di quest'ultimo con il ladder si può notare come la banda venga a trovarsi tra le 500 e le 700 bp, in maniera concorde alle attese. L'amplificato di *Odc* invece ha una grandezza di poco inferiore alle 400 bp.



**Fig. 4.21: PCR per marcatore specifico di creste neurali (35 cicli):** nell'ordine, rispettivamente: 1. cDNA caps iniettati ODC, 2. cDNA caps wt ODC, 3. cDNA caps iniettati BRA, 4. cDNA caps wt XBRA, 5. cDNA caps iniettati TWIST, 6. cDNA caps wt TWIST, 7. controllo positivo, 8. bianco RT, 9. bianco e ladder

## 5. Discussione

### 5.1 Premessa

Il mio lavoro di tesi è nato da un progetto in collaborazione con il Dott. Paolo Malatesta dell'Istituto Tumori di Genova il quale ha osservato che la sovraespressione del fattore di crescita associato alle piastrine di tipo B (*PDGF-B*), osservata in un gruppo di glioblastomi, sia in grado di indurre la perdita di inibizione da contatto cellula-cellula e di promuovere l'infiltrazione e la mobilità delle cellule, oltre alla loro proliferazione, durante lo sviluppo tumorale dei gliomi.

I gliomi costituiscono un gruppo molto eterogeneo di tumori cerebrali particolarmente aggressivi; quest'ultimi sono classificati principalmente secondo l'espressione di marcatori cellulari specifici del sistema nervoso centrale (SNC) in astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi misti e glioblastomi. Quest'ultima è la forma più maligna ed è generalmente considerata il più alto grado di astrocitoma (Grado IV), anche se è stato recentemente proposto che alcuni glioblastomi possano rappresentare invece il più alto grado di oligodendroglioma. La grande diversità dei gliomi si genera normalmente in seguito all'attivazione di numerose e differenti vie di segnalazione coinvolte appunto nell'insorgenza di questi tumori, e probabilmente, per la loro diversa origine cellulare.

Gli studi condotti dal Dott. Malatesta hanno evidenziato come la sovraespressione del *PDGF-B* induca gliomi di differente grado prodotti a partire da progenitori embrionali neurali murini. Per la prima volta, è stato inoltre dimostrato che le neoplasie indotte dal *PDGF-B* subiscono una progressiva trasformazione da tumori non carcinogenici di basso grado verso forme altamente maligne.

E' interessante notare che, nonostante il suo ruolo chiave nelle cellule tumorali, il *PDGF-B* non è in grado di trasformare in modo paracrino cellule in vicinanza del tumore. La via di segnalazione attivata dal *PDGF-B* non è, infatti, in grado, da sola di

conferire malignità alle cellule; ciò comporta l'esistenza di ulteriori lesioni molecolari che predispongano le cellule alla trasformazione neoplastica (Malatesta et al. 2009).

Saggi di trapianto (che cellule sono state trapiantate e dove?) in vivo, hanno comunque dimostrato che i tumori che ne derivano sono *PDGF-B* dipendenti perché la loro capacità di propagazione viene persa quando il transgene del *PDGF-B* viene silenziato, mentre è prontamente riacquisita dopo la sua riattivazione. In questi studi, si è inoltre fornita la prova che questa dipendenza non è dovuta alla necessità del *PDGF-B* come mitogeno, ma piuttosto al fatto che il *PDGF-B* è necessario per superare l'inibizione da contatto cellula-cellula e per conferire potenziale infiltrativo in vivo alle cellule tumorali (Malatesta et al. 2008).

Allo scopo di chiarire meglio quali siano i meccanismi molecolari e cellulari, indotti dal *PDGF-B*, in grado di conferire motilità alle cellule che lo sovraesprimono, ho condotto esperimenti utilizzando come organismo modello *Xenopus laevis*, modello di elezione per saggi di sovraespressione genica in vivo in cui grazie al suo sviluppo esterno è possibile seguire il comportamento di specifiche popolazioni cellulari. A tale scopo, ho sintetizzato mRNA trascritti in vitro da microiniettare in uno dei blastomeri di embrioni di *Xenopus* a stadio di 2 o 4 cellule. Ciò mi ha permesso di effettuare un'analisi funzionale di sovraespressione genica del ligando *PDGF-B* sulla popolazione delle cellule della cresta neurale cranica (NCC). In *Xenopus*, tali cellule infatti sono in grado di rispondere a tale fattore perché esprimono il recettore *PDGFR $\alpha$*  e continuano a produrlo anche durante la migrazione attraverso gli archi branchiali (Ho et al., 1994).

Questa popolazione cellulare costituisce un ottimo modello per studiare gli eventi di motilità cellulare in vivo; queste cellule vanno, infatti, incontro ad un processo di trasformazione epitelio-mesenchimatica: le cellule della cresta neurale, che hanno infatti inizialmente le caratteristiche di cellule epiteliali, quando iniziano la migrazione, si trasformano in cellule di tipo mesenchimatico, smettono di essere legate alle cellule adiacenti, subiscono un'alterazione dell'espressione delle

proteine di adesione e migrano fuori dalla lamina epiteliale. Gli eventi che sono implicati nello sviluppo e nella migrazione di queste cellule sono inoltre regolati dagli stessi meccanismi che regolano i passaggi dal tumore solido alla metastasi.

## **5.2 La sovraespressione dell'*hPDGF-B* altera la migrazione delle cellule delle creste neurali craniche**

Studiando il comportamento delle cellule delle creste neurali, ho potuto confermare che anche in vivo, in un sistema modello altamente dinamico e facilmente manipolabile come quello dell'embrione di *Xenopus laevis*, la sovraespressione del *PDGF-B* influisce sulla motilità cellulare. Ho effettuato quindi tale analisi sulla migrazione delle NCC mediante esperimenti di ibridazione *in situ* "whole mount" utilizzando marcatori specifici per questa intera popolazione cellulare (*FoxD3*; *Twist*). L'analisi è stata condotta a stadio di neurula tardiva (stadio 20), appena dopo l'inizio della migrazione di queste cellule, e allo stadio di tailbud (stadio 25). E' stato possibile osservare un chiaro effetto della sovraespressione del *PDGF-B* nei territori nei quali si localizzava il trascritto microiniettato correlato alla dose iniettata. In particolare, iniettando basse dosi del trascritto del *PDGF-B*, si osserva che le NCC si formano ai lati della piastra neurale ma la loro segmentazione in "streams" stereotipati viene compromessa suggerendo un possibile difetto nelle interazioni cellula-cellula. In alcuni embrioni, aumentando le dosi di trascritto, è possibile inoltre osservare anche un aumento del dominio di espressione di alcuni marcatori cresta neurale specifici. Dall'analisi del fenotipo a stadio di tailbud, corrispondente ad uno stadio di fine migrazione per le NCC è inoltre possibile osservare che tale popolazione cellulare non sembrano più in grado di migrare correttamente dalla regione più dorsale del tubo neurale in senso ventrale a livello delle tasche faringee lungo gli "streams" canonici: mandibolare, ioideo e branchiale, suggerendo un possibile ruolo del *PDGF-B* nel regolare la migrazione.

### **5.3 La sovraespressione dell'*hPDGF-B* non altera la stabilità dei compartimenti cellulari**

In seguito ho analizzato l'espressione dei geni *EphrinB2* ed *EphB1* (Fig 4.6; 4.7; 4.8; 4.9). Essi sono coinvolti nel mantenimento della stabilità dei compartimenti cellulari contribuendo a mantenere gli "streams" di migrazione delle creste distinti. La loro espressione è specifica per determinati rombomeri e sottopopolazioni delle NCC. Negli embrioni sovraesprimenti PDGF-B non ho osservato un'alterata espressione di questi geni, suggerendo che il fenotipo riscontrato in precedenza, di compromissione della segmentazione in "streams" stereotipati e la fusione delle creste non è dovuta ad un'alterazione del pattern mediato da questo fattori. Quello che si può osservare conferma i dati precedenti mostrando un forte ritardo nella migrazione, e un'espansione del dominio di espressione delle NCC. Quest'ultimo fenomeno possiamo ipotizzare sia legato ad una iperproliferazione cellulare, indotta dal *PDGF-B* stesso, come già suggerito per altri tipi cellulari quali gli oligodendrociti, le cellule staminali neurali di origine embrionale e adulta e le cellule del tessuto connettivo (Raines et al. 1990; Betsholtz; 1993; Betsholtz et al. 2001).

Per testare tale ipotesi, sto effettuando saggi di proliferazione cellulare utilizzando come marcatore la presenza della forma fosforilata dell'istone H3. Questa è infatti presente nelle cellule che sono in attiva divisione cellulare. Sto conducendo questa analisi mediante immunisto chimica su embrioni iniettati con PDGF-B e processati per ibridazione in situ "whole mount" per un marcatore specifico delle creste neurali (*Twist*), in modo da confinare l'analisi della proliferazione cellulare a questa specifica sottopopolazione.

### 5.4.1 *hPDGF*: effetto induttivo?

E' stato inoltre osservato un effetto inaspettato della sovraespressione del *PDGF-B* a seconda dei territori nei quali maggiormente si andava a localizzare il trascritto microiniettato: come menzionato in precedenza, microiniezioni del *PDGF-B* in territori che danno origine al sistema nervoso e alle creste neurali, portano a fenotipi evidenti di espansione del normale dominio di espressione delle NCC e alla fusione dei canonici "streams" migratori; tuttavia, microiniezioni condotte in posizione ventrale nell'embrione sembrano indurre in maniera autonoma e inaspettata la formazione di creste neurali ectopiche, localizzate a livello del sito di iniezione, dove il trascritto presenta la maggiore concentrazione; tale condizione è stata osservata sia allo stadio di neurula tardiva (Fig. 4.2 e-f; 4.4 e-f;) e sia allo stadio di tailbud (Fig. 4.3 c; 4.5 b);

Per valutare temporalmente quando questo possibile evento induttivo prende luogo, ho ampliato la mia analisi analizzando embrioni a stadi di neurula più precoce; anche in questo caso l'analisi è stata condotta per ibridazione in situ "whole mount" utilizzando marcatori specifici per le creste neurali cefaliche (*Twist*, *Slug*, *FoxD3*). Il possibile evento induttivo mediato dall'*hPDGF-B* per la produzione di creste neurali ex-novo, non sembra essere permesso negli stadi di neurula precoce: a stadio 13-14 (Fig. 4.10; 4.12; 4.14) infatti non si osservano mai creste neurali ectopiche in seguito ad iniezioni in posizione ventrale; tuttavia, effettuando l'analisi su embrioni appena più tardivi (stadio 15-16), la situazione sembra essere ben diversa: in questo caso, si può osservare la presenza di spot ectopici – in corrispondenza del sito di microiniezione – coerentemente con quanto visto per gli embrioni analizzati a stadio più avanzato (Fig. 4.11; 4.13; 4.16).

Tuttavia, tale processo induttivo, mediato dalla sovraespressione dell'*hPDGF-B*, oltre a non essere un evento precoce, sembra anche un evento dagli effetti estremamente ridotti: la percentuale di embrioni che mostrano infatti creste neurali in posizione ectopica è circa del 10%.

Per valutare comunque in maniera più organica, la possibilità che il *PDGF-B* sia in grado di indurre – autonomamente e senza l’influenza di fattori esterni – la formazione di creste neurali, ho condotto anche saggi su animal caps prelevati da embrioni precedentemente microiniettati con RNA messaggero di *hPDGF-B* su entrambi i lati (2/2). Come si evince dai risultati ottenuti (Fig. 4.22), sembra che effettivamente – in un tessuto pluripotente come quello degli animal caps – ci sia una debole ma riproducibile induzione di creste neurali in seguito alla sovraespressione dell’*hPDGF-B* stesso.

Tale esperimento è corroborato dall’osservazione che, in corrispondenza delle regioni in cui si localizza il trascritto negli embrioni microiniettati, nelle regioni dorsali si ha ampliamento di neuroectoderma (marcato con Sox2) a scapito a scapito dell’ectoderma non neurale (marcato con K81) (Fig. 4.16; 4.17).

#### **5.4.2 *hPDGF-B*: o effetto chemoattraente?**

Esiste un’altra possibile interpretazione della presenza di spots ectopici esprimanti marcatori di creste neurali riscontrati in posizione ventrale: dall’analisi condotta per ibridazione in situ “whole mount” – in alcuni casi – sembra che le cellule delle creste neurali vengano indotte a migrare in direzione del sito di microiniezione del *hPDGF-B* stesso (Fig. 4.2 f; 4.4 d; 4.11 d; 4.13 a; 4.13 e; 4.15 b; 4.16 b; 4.16 d). Tali cellule sembrano in qualche modo attratte e migrare – in tutti i casi evidenziati – posteriormente in direzione della sorgente di *PDGF-B*: questo inoltre sembra accadere – in modo inusuale – anche per stadi precoci (stadio 15-16), quindi a stadi in cui la migrazione non è ancora iniziata (processo che inizia infatti a stadio 19). Sembra quindi che il *PDGF-B* – in questi casi particolari – funzioni come una sorta di chemoattraente nei confronti di queste cellule. Questo potrebbe spiegare la presenza degli spots ectopici discussi in precedenza, non tanto generati quindi in seguito ad un evento di tipo induttivo, quanto per la migrazione precoce di queste cellule, in un territorio che non è di loro competenza in cui potrebbero essere attratte dal *PDGF-B*.



Tale interpretazione risulta meno suffragata da dati: in primo luogo, se si verificasse un evento di questo tipo, di migrazione collettiva verso una sorgente chemoattraente, mi aspetterei la scomparsa di queste particolari cellule dalle loro regioni di appartenenza canoniche, fenomeno che non si verifica in nessuno dei casi studiati; una possibile giustificazione di ciò, potrebbe essere una concomitante e massiva proliferazione cellulare, che garantirebbe quindi la presenza di queste cellule, sia nelle loro regioni di normale appartenenza, e sia in posizioni che normalmente non competono loro.

Per verificare il possibile ruolo del *PDGF-B* nella chemoattrazione di questa particolare popolazione cellulare, sto quindi conducendo esperimenti di trapianto di creste neurali: se il *PDGF-B* è infatti realmente in grado di promuovere la migrazione di queste cellule, io mi aspetterei che, trapiantando creste neurali provenienti da embrioni wt in embrioni iniettati ventralmente con il *PDGF-B*, queste vadano incontro ad un processo di migrazione attiva in direzione della sorgente. Tale metodica mi permette inoltre di seguire la loro migrazione attivamente nel tempo.

## 6. Conclusioni

I dati suggeriscono che:

- la sovraespressione dell'*hPDGF-B* altera la migrazione delle cellule delle creste neurali: provoca una compromissione della segmentazione delle NCC in "streams" stereotipati, un ritardo nella migrazione della NCC, un aumento del dominio di espressione di alcuni marcatori cresta neurale-specifici;
- la sovraespressione dell'*hPDGF-B* non altera la stabilità dei compartimenti cellulari: non si osserva un'alterata espressione dei geni che regolano tale processo (*Efrine*), segno che la compromissione della segmentazione in "streams" stereotipati e la fusione delle creste non è dovuta ad un'alterazione del pattern mediato da questi fattori;
- microiniezioni dell'*hPDGF-B* condotte in posizione ventrale sembrano indurre in maniera autonoma e inaspettata la formazione di creste neurali ectopiche; questo suggerisce un possibile ruolo dell'*hPDGF-B* nell'induzione di creste neurali; analisi confermata anche tramite esperimenti di "animal caps assay";
- microiniezioni dell'*hPDGF-B* condotte in posizione ventrale possono suggerire anche un effetto chemoattraente sulle cellule delle creste neurali;

I risultati ottenuti potrebbero contribuire a chiarire le basi molecolari della tumorigenicità indotta da *PDGF-B* nell'ottica di futuri approcci terapeutici.

# Bibliografia

Abboud H.E., Poptic E., and DiCorleto P. (1987) Production of platelet- derived growth factor-like protein by rat mesangial cells in culture. *I. Clin. Invest.* 80: 675-683.

Appolloni I., Calzolari F., Tutucci E., Caviglia S., Terrile M., Corte G., Malatesta P. (2009). PDGF-B induces a homogeneous class of oligodendrogliomas from embryonic neural progenitors. *Int J Cancer* 124(10): 2251–2259.

Assanah M., Lochhead R., Ogden A., Bruce J., Goldman J., Canoll P. (2006). Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci* 26: 6781–6790.

Ataliotis P., Symes K., Chou M.M., Ho L., Mercola M.(1995). PDGF signalling is required for gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 121(9): 3099-110.

Balk S.D. (1971). Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 271- 285.

Baron W., Shattil S.J., French-Constant C. (2002). The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of  $\alpha(v)\beta_3$  integrins. *EMBO J* 21:1957–1966.

Beadle C., Assanah M.C., Monzo P., Vallee R., Rosenfeld S.S., Canoll P. (2008). The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell* 19:3357–3368.

Benjamin L., Hemo I. and Keshet E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598.

Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Ostman A., Heldin C.-H., Alitalo K. and Eriksson U. (2001). PDGF-D is a specific, protease activated ligand for the PDGF b-receptor. *Nat. Cell Biol.* 3: 512-516.

Betsholtz C. (1993). The PDGF genes and their regulation. *Growth Factors* 5: 11-30.

Betsholtz C., Karlsson L. and Lindahl P. (2001). Developmental roles of platelet-derived growth factors. *BioEssays* 23: 494-507.

Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank D.A. and Rozovsky I., et al. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278: 477–483.

Boström H., Willetts K., Pekny M., Levéen P., Lindahl P., Hedstrand H., Pekna M., Hellström M., Gebre-Medhin S., Schalling M. et al. (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85: 863-873.

Brennan, J., Tilmann, C. and Capel, B. (2003). *Pdgfr-a* mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* 17: 800-810.

Bronner-Fraser M. (1994). Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *Faseb J.* 8: 699-706.

Busch C., Wasteson A., and Westermark B. (1976). Release of a cell growth promoting factor from human platelets. *Thromb. Res.* 8: 493-500.

Calver A.R., Hall A.C., Yu W.P., Walsh F.S., Heath J.K., Betsholtz C., Richardson W.D. (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869–882.

Calzolari F., Appolloni I., Tutucci E., Caviglia S., Terrile M., Corte G., Malatesta P. (2008). Tumor progression and oncogene addiction in a PDGF-B-induced model of gliomagenesis. *Neoplasia* 10:1373– 1382, following 82.

Calzolari F., Malatesta P. (2010). Recent insights into PDGF-induced gliomagenesis. *Brain Pathol.* 20(3):527-38.

Cao R., Brakenhielm E., Pawliuk R., Wariaro D., Post M.J., Wahlberg E., et al. (2003). Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat. Med* 9: 604-613.

Cayre M., Canoll P., Goldman J.E. (2009). Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 88:41–63.

Da Rocha A.B., Mans D.R., Regner A. and Schwartzmann G. (2002). Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas?. *Oncologist* 7: 17–33.

Dai C., Celestino J.C., Okada Y., Louis D.N., Fuller G.N., Holland E.C. (2001). PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 15: 1913–1925.

Dalla-Favera R., Gelmann E.P., Gallo R.C. and Wong-Staal F (1981). A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. *Nature* 292: 31–35.

Davis J.B., Stroobant P. (1990). Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 110(4):1353-60.

De Angelis L.M. (2001). Brain tumors. *N. Engl. J. Med.* 344: 114–123. Di Rocco F., Corroll R.S., Zhang J. and Black P.M. (1998). Platelet- derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 42: 341–346.

Di Tomaso E., London N., Fuja D., Logie J., Tyrrell J.A., Kamoun W., Munn L.L., Jain R.K. (2009). PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti- VEGF treatment. *PLoS One.* 4(4):e5123.

Dong J., Grunstein J., Tejada M., Peale F., Frantz G., Liang W.C. et al. (2004). VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J* 23: 2800–2810.

Doolittle R.F., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Devare S.G., Robbins K.C., Aaronson S.A., Antoniades H.N. (1983). Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221(4607): 275-7.

Eccleston P.A., Collarini E.J., Jessen K.R., Mirsky R., Richardson W.D. (1990). Schwann Cells Secrete a PDGF-like Factor: Evidence for an Autocrine Growth Mechanism involving PDGF. *Eur J Neurosci.* 2(11):985-992.

Enge M., Bjarnegard M., Gerhardt H., Gustafsson E., Kalen M., Asker N., Hammes H.P., Shani M., Fassler R. and Betsholtz C. (2002). Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J.* 21: 4307-4316.

Fellstrom B., Klareskog L., Heldin C.H., Larsson E., Ronnstrand L., Terracio L., Tufveson G., Wahlberg J., and Rubin K.. 1989. Platelet- derived growth factor receptors in the kidney-upregulated expression in inflammation. *Kidney Int.* 36:1099-1102.

Feyzi E., Lustig F., Fager G., Spillmann D., Lindahl U. and Salmivirta M. (1997). Characterization of heparin and heparan sulfate domains binding to the long splice variant of platelet-derived growth factor a chain. *J. Biol. Chem.* 272: 5518–5524.

Forsberg-Nilsson K., Erlandsson A., Zhang X. Q., Ueda H., Svensson K., Nister M., Trapp B. D., Peterson A. C. and Westermarck B. (2003). Oligodendrocyte precursor hypercellularity and abnormal retina development in mice overexpressing PDGF-B in myelinating tracts. *Glia* 4: 276-289.

Freyberger H., Brocker M., Yakut H., Hammer J., Effert R., Schifferdecker E., Schatz H. and Derwahl M. (2000). Increased levels of platelet-derived growth factor in

vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108, 106-109.

Fruttiger M., Calver A. R., Kruger W. H., Mudhar H. S., Michalovich D., Takakura N., Nishikawa S. and Richardson W. D. (1996). PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17: 1117-1131.

Fruttiger M., Karlsson L., Hall A.C., Abramsson A., Calver A.R., Bostrom H. et al. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457–467.

Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M., Mukasa A., Stommel J.M., Stegh A. et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683–2710.

Giese N.A., Robbins K.C., and Aaronson S.A. (1987). The role of individual cysteine residues in the structure and function of the v-sis gene product. *Science* 236:1315-1318.

Gnessi L., Basciani S., Mariani S., Arizzi M., Spera G., Wang C., Bondjers C., Karlsson L. and Betsholtz C. (2000). Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J. Cell Biol.* 149: 1019-1025.

Grotendorst G.R., Chang T., Seppa H.E.J., Kleinman H.K., and Martin G.R. (1982). Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J. Cell.Physiol.* 113: 261-266.

Guo P., Hu B., Gu W., Xu L., Wang D.,Huang H.J. et al. (2003). Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 162:1083 1093.

Harland RM. (1991). In situ hybridization: an improved whole mount method for *Xenopus* embryo. *Methods Cell Biol.* 36: 685-695.

Heidaran M.A., Beeler J.F., Yu J.C., Ishibashi T., LaRochelle W.J., Pierce J.H. and Aaronson S.A. (1993). Differences in substrate specificities of alpha and beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptors. Correlation with their ability to mediate PDGF transforming functions. *J. Biol. Chem.* 268: 9287–9295.

Heldin C.H., Westermark B. (1990). Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.* 1: 555-566.

Heldin C.H., Ostman A., and Westermark B. (1993). Structure of platelet-derived growth factor: Implications for functional properties. *Growth Factors* 8: 245-252.

Heldin C.H., Westermark B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283–1316.

Hellström M., Gerhardt H., Kalen M., Li X., Eriksson U., Wolburg H. and Betsholtz C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* 153: 543-554.

Hensey C., Gautier J. (1998). Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev. Biol.* 203, 36-48.

Hermansson M., Nister M., Betsholtz C., Heldin C.H., Westermark B., Funa K. (1988). Endothelial cell hyperplasia in human glioblastoma: coexpression of mRNA for platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7748–7752.

Hermanson M., Funa K., Hartman M., Claesson-Welsh L., Heldin C.H., Westermark B., Nister M. (1992). Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52:3213–3219.

Ho L, Symes K, Yordán C, Gudas LJ, Mercola M (1994). Localization of PDGF A and PDGFR alpha mRNA in *Xenopus* embryos suggests signalling from neural ectoderm and pharyngeal endoderm to neural crest cells. *Mech Dev* 48(3):165-74



Hoch R.V., Soriano P. (2003). Roles of PDGF in animal development 130(20):4769-84.

Holland E.C., Celestino J., Dai C., Schaefer L., Sawaya R.E. and Fuller G.N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet.* 25: 55–57.

Iida H., Seifert R., Alpers C.E., Gronwald R.G.K., Phillips P.E., Pritzl P., Gordon K., Gown A.M., Ross R., Bowen-Pope D.F., and Johnson R.J. (1991). Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6560-6564.

Jackson E.L., Garcia-Verdugo J.M., Gil-Perotin S., Roy M., Quinones- Hinojosa A., VandenBerg S., Alvarez-Buylla A. (2006). PDGFR alpha- positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma- like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187 -199.

Karlsson L., Lindahl P., Heath J. K. and Betsholtz, C. (2000). Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-a deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development* 127: 3457-3466.

Khoshyomn S., Penar P.L., Rossi J., Wells A., Abramson D.L. and Bhushan A. (1999). Inhibition of phospholipase C-gamma1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery* 44: 568–577.

Kleihues P. and Cavenee W.K. (2000). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics: Tumours of the Nervous System, (second ed.), WHO Publications Centre USA, Albany.

Klinghoffer R.A., Mueting-Nelsen P.F., Faerman A., Shani M. and Soriano P. (2001). The two PDGF receptors maintain conserved signaling in vivo despite divergent embryological functions. *Mol. Cell* 7: 343–354.

Klinghoffer R.A., Hamilton T.G., Hoch R., Soriano P. (2002). An allelic series at the PDGF $\alpha$ R locus indicates unequal contributions of distinct signaling pathways during development. *Dev Cell* 2: 103–113.

LaRochelle W. J., Jeffers M., McDonald W. F., Chillakuru R. A., Giese N. A., Lokker N. A., Sullivan C., Boldog F. L., Yang M., Vernet C. et al. (2001). PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat. Cell Biol.* 3:517-521.

Levéen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E. and Betsholtz C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8: 1875-1887.

Li X., Ponten A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Backstrom G., Hellström M., Boström H., Li H. et al. (2000). PDGFC is a new protease-activated ligand for the PDGF  $\alpha$ -receptor. *Nat. Cell Biol.* 2:302-308.

Li J. and Hoyle G. W. (2001). Overexpression of PDGF-A in the lung epithelium of transgenic mice produces a lethal phenotype associated with hyperplasia of mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 239: 338-349.

Lindahl P., Johansson B. R., Levéen P. and Betsholtz C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-245.

Lokker N.A., Sullivan C.M., Hollenbach S.J., Israel M.A., Giese N.A. (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* 62:3729–3735.

Louis D.N., Holland E.C., and Cairncross J.G. (2001). Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol* 159: 779–786.

Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvett A. et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109.

Majack R.A., Cook S.C., and P. Borstein. (1985). Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 101: 1059-1070.

Malatesta P., Appolloni I., Calzolari F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331:165–178.

Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K., Green MR. (1985). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* 12: 7035.

Meulemans D., Bronner-Fraser M. (2005). Central role of gene cooption in neural crest evolution. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 304,298-303.

Nieuwkoop PD, Faber J. (1967). Normal Table of Development of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland.

Nister M., Libermann T.A., Betsholtz C., Pettersson M., Claesson-Welsh L., Heldin C.H. et al. (1988). Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Res* 48:3910–3918.

Noden DM. (1983). The role of neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev. Biol.* 96: 144-65.

Ostman A., Andersson M., Backstrom G., Hellman U., George-Nascimento C., Westermarck B., and Heldin C.H. (1992). Assignment of interchain disulphide bonds in platelet-derived growth factor (PDGF) and evidence for agonist activity of monomeric PDGF. *J. Biol. Chem.* 267: 11260-11266.

Owen A.J.I., Geyer R.P., and Antoniades H.N. (1982). Human platelet- derived growthfactor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3203-3207.

Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P. et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807–1812.

Perris R. (1997). The extracellular matrix in neural crest-cell migration. *Trends neurosci.* 20: 23-31.

Pietras K., Pahler J., Bergers G., Hanahan D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 5:19.

Pringle N.P., Mudhar H.S., Collarini E.J. and Richardson W.D. (1992). PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115: 535–551.

Raff M.C. (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 243: 1450-1455.

Raines E.W., D.F. Bowen-Pope, and R. Ross. (1990). Platelet-derived growth factor. *Handb. Exp. Pharmacol.* 95: 173-262.

Raines E. and R. Ross. 1993. Platelet-derived growth factor in vivo. In *Biology of platelet-derived growth factor*, 5 (ed. B. Westermark and C. Sorg), pp. 74--114. Karger, Basel, Switzerland.

Rajasekhar V.K., Viale A., Socci N.D., Wiedmann M., Hu X. and Holland E.C. (2003). Oncogenic ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol. Cell* 12: 889–901.

Richardson W.D. (1990). The oligodendrocyte-type-2 astrocyte lineage. *Sem. Neurosci.* 2: 445-454.

Ross R., Glomset J., Kariya B. and Harker L. (1974). A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1207-1210.

Sasahara M., Fries J.W., Raines E.W., Gown A.M., Westrum L.E. and Frosch M.P., et al. (1991). PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell* 64: 217–227.

Sasahara M., Amano S., Sato H., Yang J.G., Hayase Y. and Kaneko M., et al. (1998). Normal developing rat brain expresses a platelet-derived growth factor B chain (c-sis) mRNA truncated at the 5d end. *Oncogene* 16:1571–1578.

Sauer M.K. and Donoghue D.J. (1988). Identification of nonessential disulfide bonds and altered conformations in the v-sis protein, a homolog of the B chain of platelet-derived growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1011-1018.

Seoane J., Le H.V., Shen L., Anderson S.A. and Massague J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211–223.

Shih A.H., Dai C., Hu X., Rosenblum M.K., Koutcher J.A., Holland E.C. (2004). Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis. *Cancer Res* 64:4783–4789.

Shih A.H., Holland E.C. (2006). Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett* 232:139-147.

Shultz P.J., DiCorleto P.E., Silver B.J., and Abboud H.E. (1988). Mesangial cells express PDGF mRNAs and proliferate in response to PDGF. *Am. J. Physiol.* 255: F674-F684.

Siegbahn A., Hammacher A., Westermarck B., and Heldin C.H. (1990). Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes and granulocytes. *J. Clin. Invest.* 85: 916-920.

Silver B.J., Jaffer F.E., and Abboud H.E. (1989). Platelet-derived growth factor synthesis in mesangial cells: Induction by multiple peptide mitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1056-1060.

Smith C.L., Tallquist M.D. (2010). PDGF function in diverse neural crest cell populations. *Cell Adh Migr* 4 (4): 561-6.

Soriano P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8:1888–1896.

Soriano P. (1997). The PDGF $\alpha$  receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124:2691-2700.

Tsirakis G., Pappa C.A., Kanellou P., Stratinaki M.A., Xekalou A., Psarakis F.E., Sakellaris G., Alegakis A., Stathopoulos E.N., Alexandrakis M.G. (2011). Role of platelet-derived growth factor AB in tumour growth and angiogenesis in relation with other angiogenic cytokines in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* : 10.1002/hon.1014.

Uhrbom L., Hesselager G., Nister M., Westermarck B. (1998). Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 58:5275–5279.

Vignais M.L., Sadowski H.B., Watling D., Rogers N.C. and Gilman M. (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol. Cell Biol.* 16: 1759–1769.

Waterfield M. D., Scrase G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermarck B., Heldin C.H., Huang J. S. and Deuel T. F. (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28<sup>sis</sup> of simian sarcoma virus. *Nature* 304:35-39.

Wolf R.M., Wilkes J.J., Chao M.V. and Resh M.D. (2001). Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J. Neurobiol.* 49: 62–78.

Yeh H.J., Ruit K.G., Wang Y.X., Parks W.C., W.D. Snider and T.F. Deuel (1991). PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 64: 209-216.

Zhu Y. and Parada L.F. (2002). The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer* 2: 616–626.

